

ANNALES  
DE  
L'INSTITUT PASTEUR

---

LE RÔLE DE L'ALEXINE DANS LE RENFORCEMENT  
DE LA VIRULENCE MICROBIENNE,

par les D<sup>rs</sup> JULES BORDET et ERNEST RENAUX.

(*Institut Pasteur de Bruxelles.*)

C'est un fait général que la virulence microbienne s'accroît par les passages. La sélection intervient à titre prédominant dans ce phénomène. Les individus microbiens qui peuplent une culture inoculée ne sont pas complètement identiques. Ceux qui résistent le moins aux forces défensives de l'organisme étant éliminés, une épuration de la culture injectée s'effectue, ne laissant subsister que les germes les moins vulnérables, c'est-à-dire les plus dangereux.

Il y a fort longtemps déjà (1), l'un de nous a signalé le rôle décisif joué à ce propos par les leucocytes et a décrit les particularités auxquelles certains individus microbiens doivent de pouvoir esquiver la phagocytose et de manifester en conséquence une virulence extrême. Lorsqu'on injecte dans le péritoine du cobaye une dose de streptocoques virulents légèrement supérieure à la dose minima mortelle, l'examen de l'exsudat extrait une heure ou deux après l'inoculation montre que

(1) Recherches sur la phagocytose. Ces *Annales*, 1896; Le sérum anti-streptococcique, *ibidem*, 1897.

quelques microbes se sont entourés d'une gaine qui ne se colore pas ou se teint en rose pâle par le bleu de méthylène ou de toluidine. Or, ces streptocoques encapsulés ne se laissent pas englober même lorsque les phagocytes ont afflué en grand nombre dans la cavité péritonéale, tandis que leurs congénères qui n'ont pas réussi à s'envelopper de cette coque protectrice sont bientôt capturés et détruits dans le protoplasme leucocytaire. Ultérieurement, divers auteurs, notamment Sawtchenko, Stiennon, Löhlein, ont observé des faits identiques pour ce qui concerne d'autres microbes, tels celui du charbon, de la peste, le pneumocoque, etc. Il est probable que la gaine, de nature gommeuse, est formée d'hydrates de carbone. Certains colorants qui les teignent en rose colorent semblablement la gélose, par exemple; c'est le cas du bleu de toluidine. Les polysaccharides du pneumocoque ont été spécialement étudiés au point de vue antigénique par Avery et Heidelberger.

Échappant aux phagocytes, les microbes engainés se multiplient sans entraves et donnent une descendance investie au plus haut degré de l'aptitude à s'entourer d'une semblable auréole. La sélection opérée par les phagocytes aboutit donc à une exacerbation très prononcée de la virulence.

Il est rationnel de présumer que le pouvoir bactéricide humoral produira des effets analogues en supprimant dans la culture inoculée les individus les plus sensibles. Nous allons voir que le *B. coli* fournit un exemple très démonstratif de ce fait. Il s'agit du bacille *coli* que nous utilisons depuis longtemps pour les expériences d'autolyse transmissible. Injectée dans le péritoine du cobaye, cette culture se montre douée d'une assez grande virulence.

Mais cette culture contient couramment les deux variétés bien connues que l'on dénomme, en raison de l'aspect des colonies isolées, type bombé ou lisse (Smooth) et type plat ou rugueux (Rough). Or, l'étude de diverses espèces microbiennes susceptibles de présenter les deux types a conduit généralement, comme on sait, à la conclusion que le type bombé est plus pathogène que le type plat.

C'est à Eisenberg (1) que l'on doit la première démonstration

(1) *Centralbl. f. Bakt. Orig.*, 63, 1912 et 73, 1914.

du fait que la technique des colonies isolées permet d'extraire, d'une culture pure d'un microbe pathogène (charbon), des germes très inégalement virulents. Manninger (1) fit la même constatation à propos du microbe du choléra des poules. De Kruif (2) obtint un résultat analogue en opérant sur un microbe qui provoque une septicémie des lapins. Cet auteur consigna, en outre, le fait que l'inégalité de virulence est en rapport avec la diversité d'aspect des colonies, le type plat étant beaucoup moins pathogène. Comme nous venons de le rappeler, cette donnée due à De Kruif a été confirmée ensuite pour ce qui concerne d'autres espèces microbiennes. Notre culture de *B. coli* se comporte semblablement. La différence de virulence entre les deux types est même considérable. Si l'on injecte dans le péritoine d'un cobaye pesant environ 350 grammes des suspensions en solution physiologique de cultures sur gélose de format ordinaire, âgées de vingt-quatre heures, d'une part du type bombé, d'autre part du type plat, on trouve qu'une culture entière de celui-ci est inoffensive, tandis que la dose de type bombé mortelle en moins de vingt-quatre heures est inférieure à un quinzième de culture. Le type plat ne semble pas se multiplier dans le péritoine. Une heure après l'inoculation, on trouve dans l'exsudat des formes gonflées peu colorables; bientôt, les leucocytes affluent et la phagocytose est rapidement totale.

Or, le type plat, qui n'est pas virulent, est fort sensible à l'influence bactéricide de l'alexine du sérum de cobaye ou de lapin, tandis que le type bombé fait preuve d'une résistance très prononcée. Après chauffage à 56°, le sérum ne manifeste plus aucun pouvoir bactéricide vis-à-vis de l'une ou l'autre des deux races.

Ensemençons tout d'abord ces deux races dans des tubes contenant un mélange en parties égales de bouillon et de sérum (de cobaye ou de lapin) chauffé à 56°. Procédons à quelques repiquages en série dans ce même milieu, afin que les microbes y soient bien acclimatés. Ensuite, de cultures semblables, d'une part de type bombé, d'autre part de type plat, introduisons une goutte respectivement dans deux tubes

(1) *Centralbl. f. Bakt. Orig.*, 83, 1919, p. 520.

(2) *Journ. of Experim. Medicine*, vol. XXXIII, 1921.

contenant 5 cent. cubes de mélange en parties égales de bouillon et de sérum non chauffé, récemment obtenu, de cobaye ou de lapin. Au bout de trois ou quatre heures, le liquide ensemencé de type bombé est déjà trouble, l'autre est limpide et reste tel encore pendant plusieurs heures. Mais on constate le lendemain que ce milieu ensemencé de type plat présente un trouble abondant et diffus. Or, la culture ainsi obtenue n'est pas identique au type ensemencé, elle appartient au type bombé. La transformation est radicale. L'isolement de cette culture ne fournit que des colonies de type bombé. On sait, d'ailleurs, qu'il est aisé de distinguer les deux types grâce à une série d'indices, notamment l'aspect des colonies isolées, celui des cultures en bouillon, le type bombé donnant un trouble diffus sans dépôt, tandis que le plat forme des flocons qui se déposent laissant le liquide clair; le fait enfin que si l'on examine par transparence deux cultures jeunes sur gélose placées devant une lampe, celle du type plat apparaît terne, tandis que celle du type bombé se montre irisée des couleurs de l'arc-en-ciel. Tandis que la culture du type plat en bouillon-sérum 56° conserve tous les attributs de ce type, celle du type plat en bouillon-sérum alexique offre tous les caractères du type bombé, y compris la haute virulence: par injection intrapéritonéale, elle tue le cobaye à dose inférieure à un quinzième de culture sur gélose.

Mais on dispose, en outre, pour distinguer les deux types, d'un autre critère, sur lequel nous avons maintes fois insisté, et que nous signalons encore dans une note publiée dans ce même numéro des *Annales*. D'un bactériophage actif sur le *B. coli*, l'un de nous a extrait deux principes lytiques distincts: le premier, dit faible, lysant énergiquement le type bombé, mais inoffensif pour le type plat; le second, dit fort, lysant les deux races. Mis en présence de principe faible, les microbes du type bombé se lysent, seules survivent quelques unités capables d'engendrer une descendance du type plat, de sorte que ce principe se comporte comme s'il métamorphosait le type bombé en type plat.

Or, si dans deux tubes contenant, en mélange avec partie égale de bouillon, l'un du sérum non chauffé, l'autre du sérum chauffé à 56°, on ensemence le type plat, ce germe conserve dans le second milieu ses caractères primitifs et notamment

son insensibilité au principe faible, tandis que, se muant en type bombé dans le premier milieu, il devient de ce fait très sensible au principe faible.

Une conséquence facile à prévoir de ces faits consiste en ce qu'un mélange de bouillon, de sérum alexique et de principe faible, manifeste un pouvoir bactéricide extrêmement énergique vis-à-vis aussi bien du type bombé que du type plat. Ensemencé dans un tel milieu, le type plat, destructible par l'alexine, ne peut engendrer des individus de type bombé, résistant à celle-ci, puisque ce type est éliminé par le principe. Si l'on ensemence le type bombé, qui sous l'action du principe peut engendrer le type plat, celui-ci néanmoins ne saurait apparaître puisque l'alexine le détruit.

Une donnée intéressante se dégage de l'ensemble de ces expériences. C'est la promptitude avec laquelle, sous l'action tant de l'alexine que du principe faible, la culture ensemencée appartenant à l'une des variétés acquiert intégralement les caractères de l'autre. En moins de vingt-quatre heures, le plat, touché par l'alexine, peut fournir du bombé absolument typique, de même qu'en présence du principe le bombé peut engendrer du plat doué de toutes les particularités propres à cette variété. Il est curieux que les deux types restent aussi tranchés, même lorsqu'ils n'ont pu disposer, pour dériver l'un de l'autre, que d'un laps de temps très bref.

Il va sans dire que les constatations résumées ci-dessus exigent, pour être nettes, que les deux races de *B. coli* utilisées soient soigneusement maintenues à l'état pur. Comme elles sont aptes à dériver l'une de l'autre, le type bombé notamment produisant aisément quelques individus du type plat, il est nécessaire de les soumettre, pour qu'elles restent bien distinctes, à une sélection fréquente et rigoureuse. On ne saurait, pour les entretenir, se borner à de simples repiquages successifs. On doit à chaque repiquage procéder à un isolement sur gélose, et choisir une colonie montrant de la façon la plus typique les caractères de la race. Cette colonie est reportée sur gélose, et c'est à la culture ainsi obtenue, laquelle peut se conserver au moins un mois, qu'on a recours pour les expériences. A certains intervalles, on la repique en isolant comme il vient d'être dit.

On peut se demander si cette technique ne pourrait pas conduire, au bout d'un temps assez prolongé, à l'obtention de types tellement purs et tranchés qu'ils seraient désormais incapables de se métamorphoser. En réalité, la culture du type bombé ne perd pas, dans de telles conditions, l'aptitude à faire apparaître une postérité de type plat. Mais les germes investis de cette faculté n'y sont pas très nombreux. On peut en apprécier la proportion en étalant sur toute la surface d'une gélose en-tube une goutte de culture en bouillon et y déposant, vingt ou trente minutes plus tard, une gouttelette de principe faible qui, descendant sur la surface, laisse une traînée au niveau de laquelle les microbesensemencés sont lysés, tandis que, tout autour, le développement s'effectue avec luxuriance. Au bout de quelques heures, la zone mouillée par le principe se constelle de quelques colonies du type plat résistant, dont le nombre donne une idée de la proportion d'individus microbiens susceptibles, dans la culture du type bombé, d'engendrer l'autre race. D'autre part, on peut, en recourant à l'alexine, évaluer combien la culture en bouillon du type plat contient d'unités capables d'acquérir les qualités du type bombé. De tels individus sont rares. En effet, si l'onensemence d'une goutte de culture en bouillon du type plat une série de tubes contenant tous 5 cent. cubes de mélange en parties égales de bouillon et de sérum alexique, on constate souvent que plusieurs de ces tubes restent indéfiniment stériles, la culture du type bombé n'apparaissant que dans certains d'entre eux.

## RACES MICROBIENNES ET DIVERSITÉ DES PRINCIPES AUTOLYTIQUES,

par les D<sup>rs</sup> JULES BORDET et ERNEST RENAUX.

(*Institut Pasteur de Bruxelles.*)

Divers faits signalés dans la présente note, par exemple celui de l'agglutination des microbes morts par le principe lytique, ont déjà été mentionnés brièvement dans de récentes publications (1) que l'un de nous a consacrées à la discussion générale du problème de l'autolyse transmissible ou bactériophagie. Nous les reprenons ici en exposant les résultats d'expériences complémentaires.

Dès leur premier mémoire sur la bactériophagie (1920), Bordet et Ciuca, en proposant leur théorie d'après laquelle l'agent lytique n'est pas un virus, mais est un principe chimique élaboré par les bactéries elles-mêmes qui sont aptes à être lysées, ont suggéré l'idée que les principes lytiques interviennent dans l'évolution des espèces microbiennes et doivent être en rapport avec les phénomènes de mutation qui conduisent à l'apparition de types distincts au sein de cultures pures. Les microbes sont sujets à une certaine variabilité et cependant les espèces maintiennent leurs caractères fondamentaux, de sorte qu'on est amené à présumer l'existence d'un mécanisme régulateur auquel les principes lytiques ne sont vraisemblablement pas étrangers. En d'autres termes, la bactériophagie, qui selon la théorie de Bordet et Ciuca est en réalité une autolyse, joue un rôle dans la concurrence qui s'établit entre individus microbiens de même espèce.

Cette idée se précisa nettement à la faveur de deux notions que nous considérons comme essentielles et sur lesquelles nous

(1) J. BORDET, The theories of Bacteriophage. Croonian lecture. *Proceed of the Royal Society*, B. vol. 107, 1931, p. 398. La lyse transmissible. *C. R. du 1<sup>er</sup> Congrès international de Microbiologie*, 1, Paris, 1930.

avons insisté maintes fois dans les dernières années, car elles corroborent manifestement la théorie de l'autolyse. La première consiste en ce que l'on peut retirer, d'un bactériophage actif sur la culture de *B. coli*, un principe particulier qui lyse, non pas indistinctement tous les microbes présents dans cette culture, mais seulement les individus appartenant à l'un de ces deux types si nettement distincts qui, très fréquemment, se trouvent mélangés dans les cultures des espèces du groupe coli-typique. Ainsi s'atteste une remarquable corrélation entre l'individualité d'un principe déterminé et celle d'un type microbien nettement caractérisé. Le principe spécial en question lyse le type formant sur gélose des colonies lisses et bombées et donnant en bouillon un trouble diffus (type Bombé ou Smooth), tandis qu'il respecte l'autre type (type Plat ou Rough), lequel constitue sur gélose des colonies plates et rugueuses et donne en bouillon des flocons qui se déposent. Nous désignerons ces deux types sous les lettres BS et PR. Mais le bactériophage initial, que nous appellerons principe total et qui est actif sur la culture entière de *B. coli* (laquelle comme on sait renferme d'habitude les deux types), contient, à côté du principe particulier ci-dessus mentionné s'adressant au type BS, un autre principe, capable de lyser indifféremment les deux races. Nous avons appelé principe faible le premier principe pour la raison qu'il ne lyse que l'un des types, tandis que nous appelons principe fort le second principe actif sur les deux races. Le mélange de ces deux principes reproduit le principe initial ou total.

L'un de nous a décrit, il y a longtemps déjà (1), les procédés d'ailleurs très simples qui permettent d'isoler, du principe total, le principe faible. Notamment, celui-ci est plus diffusible que l'autre. Ensemençons une gélose en tube, sur toute sa surface, de culture de *B. coli* contenant les deux types, ou de préférence de culture constituée seulement du type BS. Déposons ensuite, sur un point de cette surface, une gouttelette du bactériophage total. Après séjour à l'étuve, la zone de la gélose touchée par le principe est restée nue, tandis que tout autour la culture est luxuriante. Or, si l'on touche avec le fil de pla-

(1) J. BORDET. *C. R. de la Soc. de Biol.*, 87, 1922, p. 987 et *Ces Annales*, 1925.

tine l'extrême limite de la zone de lyse, on a des chances de recueillir le principe faible à l'état pur, car il se diffuse plus loin que le principe fort. On peut aussi ensemer II ou III gouttes de culture de *B. coli* riche en type BS dans un tube de bouillon additionné d'une trace de bactériophage, puis, peu de temps après, c'est-à-dire avant que le bactériophage n'ait eu le temps de se régénérer abondamment, étaler sur gélose I goutte de ce bouillon. Après séjour à l'étuve, la gélose montre quelques taches très apparentes qui s'entourent d'un halo et qui dénotent l'attaque du type BS par le principe faible approprié à celui-ci. On repique au fil de platine l'une de ces taches sur bouillonensemencé de type bombé, étale ensuite ce bouillon sur gélose, obtient ainsi de nouvelles taches que l'on repique, de façon à réaliser plus sûrement encore la séparation du principe faible. Quant au principe fort, on l'isole aisément grâce au fait que le type plat (PR) est inapte à la régénération du principe faible. Partant du principe total initial, il suffit donc de lui faire subir en série quelques passages en bouillonensemencé du type PR pur, en n'introduisant chaque fois dans les bouillons qu'une trace infime de principe; le principe faible contenu dans le principe initial disparaît au cours de ces passages, puisque PR ne le reproduit pas. Notons encore que la séparation des deux principes est facilitée du fait que ceux-ci donnent des taches dont l'aspect est différent. Ce fait a été observé par Gratia qui a poursuivi à notre Institut l'étude de ces deux principes. Bail a reconnu que certains bactériophages peuvent donner lieu à des taches nettement dissemblables, se distinguant notamment par leurs dimensions, et que l'on peut séparer ainsi, en repiquant des taches différentes, deux principes donnant respectivement de grandes et de petites taches. Or, Gratia a constaté que notre principe faible correspond au principe à grandes taches de Bail, tandis que notre principe fort produit de petites taches. La méthode d'isolement de Bail peut donc être utilisée pour la séparation des deux principes que nous considérons.

Rappelons brièvement comment on opère pour entretenir indéfiniment, à l'état pur, les deux principes que l'on a séparés. Il suffit, à cet effet, de disposer des deux races de *B. coli*, soigneusement maintenues à l'état pur. Le principe faible ne se

reproduit qu'à l'intervention du type bombé, car il n'attaque que celui-ci. On le régénère donc en en introduisant une trace, un millionième de centimètre cube par exemple, dans 5 cent. cubes de bouillon qu'on ensemence d'une goutte de culture en bouillon du type bombé. Rappelons qu'au bout d'un temps assez prolongé, une dizaine d'heures par exemple, le liquide se peuple de *B. coli* du type plat, lequel ne subit pas de lyse, ce qui démontre que le principe faible employé ne contenait pas trace de principe fort. Quant à celui-ci, il lyse les deux races, mais, pour le reproduire, on utilise uniquement le type plat, lequel, nous venons de le rappeler, ne saurait régénérer le principe faible qui ne l'attaque pas.

La seconde donnée expérimentale importante qui vient à l'appui de la théorie autolytique est relative aux microbes spontanément lysogènes. On savait, grâce à Lisbonne et Carrère, que certaines espèces appartenant notamment au groupe *Coli* déclenchent la lyse transmissible d'espèces différentes, tel le bacille dysentérique.

L'un de nous (1) montra que les divers individus microbiens peuplant une telle culture lysogène ne possèdent pas au même degré ce pouvoir. Mais il constata, en outre (2), que les microbes lysogènes en question peuvent agir lytiquement non seulement sur une espèce différente, tel le bacille dysentérique, mais aussi sur certains individus appartenant à leur propre espèce. En effet, si l'on soumet une telle culture lysogène à la technique de l'isolement, on obtient aux dépens de colonies séparées une série de cultures filles dont certaines sont capables, bien que ne se lysant pas elles-mêmes, de déclencher la lyse de certaines autres. Par conséquent, dans une culture pure, une différenciation spontanée peut survenir, donnant lieu à l'apparition de types microbiens suffisamment distincts pour pouvoir manifester les uns envers les autres un antagonisme qui se trahit précisément par des réactions lytiques. Il y a des types qu'on peut qualifier d'agressifs, il en est d'autres qui sont réceptifs, car ils se laissent lyser par les précédents. Étudiant

(1) BORDET. Apparition spontanée du pouvoir lysogène dans les cultures pures. *C. R. Soc. Biol.*, 90, janvier 1924, p. 96.

(2) Ces *Annales*, 1925 et *Bull. de la Classe des Sciences de l'Académie royale de Belgique*, n° 12, 1925, p. 818.

le staphylocoque, Bordet et Renaux (1) ont confirmé et étendu cette notion. On trouve même certains types qui, sensibles aux sécrétions lytiques d'une autre race, sont eux-mêmes capables de lyser une troisième variété, de sorte que, selon l'individualité des germes qu'ils rencontrent, ces types peuvent se comporter soit comme réceptifs, soit comme agressifs. La notion du rôle que jouent les phénomènes lytiques dans la concurrence entre individus de même espèce se dégage de ces expériences avec une parfaite netteté, et nous nous dispensons d'y revenir ici. Nos recherches à ce sujet ont d'ailleurs été confirmées notamment par Hadley et Jimenez (2).

Mais il convient de développer quelque peu la notion précédente, c'est-à-dire de compléter les renseignements relatifs aux principes faible et fort dont il est question plus haut. Nous venons de rappeler cette caractéristique essentielle que le principe faible est spécialement approprié au type BS, qu'il lyse à dose extrêmement faible, tandis que le type PR le tolère et ne le reproduit pas. Toutefois, l'un de nous avait constaté, en 1923, que ce principe, ajouté à forte dose au type PR, peut, notamment à la faveur de passages successifs sur ce type, donner lieu à l'apparition du principe fort. Dans la suite, nous avons pu obtenir encore le même résultat, mais nous devons signaler que cette expérience ne réussit plus lorsque le principe faible a été reproduit à de très nombreuses reprises, c'est-à-dire a très fréquemment réagi exclusivement sur le type BS bien pur utilisé pour sa régénération. Ce contact exclusif et réitéré avec le type BS affine tellement sa spécificité pour ce dernier qu'on ne parvient plus à l'adapter au type PR, même en le faisant agir à très forte dose sur celui-ci. Quant au principe fort, lequel lyse les deux types, il ne perd aucunement son pouvoir originel d'attaquer également le type BS lorsqu'il a été très fré-

(1) Ces *Annales*, 1928.

(2) Ces auteurs (*Journal of infectious Diseases*, 48, février 1931, p. 176) ont obtenu, aux dépens d'une vieille culture en bouillon de paratyphique A, certaines colonies investies du pouvoir de lyser d'autres types microbiens de même espèce. Ce résultat est entièrement conforme à ceux que nous avons obtenus en opérant soit sur le *B. coli* de Lisbonne, soit sur le staphylocoque.

On trouve aussi des exemples de races agressives et réceptives dans le travail de Den Dooren de Jong (*Académie des Sciences des Pays-Bas*, vol. 35, 1932).

quemment régénéré à l'intervention exclusive du type PR (1). Semblablement, lorsqu'on le régénère en série à l'intervention du type BS, il garde parfaitement son aptitude à lyser le type PR, il ne se convertit donc pas en principe faible. Soumis à l'action du principe fort, le type BS donne lieu, un peu plus aisément en général que ne le fait le type PR dans les mêmes conditions, à l'apparition de microbes résistants. En effet, lorsqu'on ensemence de type BS la surface entière d'un tube de gélose et qu'on dépose sur cette surface une gouttelette de principe fort, on observe après quelques heures d'étuve une traînée lytique où la gélose est restée nue, mais qui, un certain temps après, se recouvre de colonies translucides assez nombreuses pour être confluentes. Les microbes ensemencés sont sensibles au principe, mais peuvent néanmoins fournir une culture secondaire abondante. Toutefois, la résistance de celle-ci n'est pas absolue, car, si on la repique en bouillon, ce liquide nutritif, qui se trouble fortement tout d'abord, se clarifie ensuite très nettement. Le développement de ces germes de type BS résistants au principe fort se fait mieux sur gélose qu'en bouillon. Notons encore que la diversité d'aspect des taches lytiques dépend bien plus de la nature du principe que de la nature des microbes en expérience. Le principe faible, mis sur gélose en présence du type BS, donne de grandes taches; le principe fort, qu'il agisse sur le type BS ou sur le type PR, donne de petites taches apparaissant comme de petites cupules creusées dans la couche microbienne mais qui, surtout s'il s'agit du type BS, ne sont pas toujours assez profondément excavées pour que le milieu nutritif devienne tout à fait transparent à ce niveau. Enfin, il convient de signaler que le principe fort lyse énergiquement le bacille dysentérique, tandis que, même après plusieurs passages, le principe faible n'attaque pas cette espèce. Nettement plus spécifique que le principe fort, il n'attaque pas non plus, contrairement à celui-ci, le *B. coli* Lisbonne.

(1) Nous ne pouvons donc pas confirmer une opinion émise par Gratia et d'après laquelle on peut retirer de notre bactériophage total un principe lytique pour le type PR mais inactif vis-à-vis du type BS. Lorsqu'on expérimente sur une culture de *B. coli* normale, c'est-à-dire bien sensible à l'action du bactériophage total, on trouve toujours que le type BS est sensible au principe fort comme au principe faible, et tout principe attaquant PR attaque aussi BS.

Comme l'un de nous l'a signalé il y a longtemps, la conséquence la plus remarquable, du fait que le principe faible attaque uniquement le type BS, consiste en ce que celui-ci, ensemencé dans du bouillon additionné d'une trace de ce principe, fournit au bout d'un certain nombre d'heures une culture pure du type PR. Le principe faible se comporte donc comme s'il métamorphosait la première race en la seconde. En réalité, le phénomène résulte de ce que les cultures de BS contiennent toujours quelques unités susceptibles d'engendrer une postérité appartenant au type PR, c'est-à-dire insensible au principe faible. Il convient de remarquer à ce propos que le type PR est toujours identique à lui-même, qu'on l'ait obtenu par l'action du principe faible sur le type BS ou directement, par isolement sur gélose, en l'absence de tout principe, d'une culture normale de *B. coli* contenant les deux races. Quel que soit le mode d'obtention, le type PR possède les mêmes caractères de culture et manifeste la même insensibilité au principe faible comme la même sensibilité au principe fort. S'il est vrai que le type BS, devenu insensible au principe faible pour la raison qu'il s'est transformé en type PR, manifeste la sensibilité habituelle de ce type PR vis-à-vis du principe fort, on peut, d'autre part, comme il a été dit plus haut, adapter le type BS au principe fort. Mais les germes BS obtenus de cette façon, et qui tolèrent mieux qu'antérieurement le principe fort, ont conservé intégralement leur sensibilité originelle au principe faible. Ce fait corrobore de façon frappante la notion que les deux principes sont réellement distincts.

Ayant ainsi récapitulé une série de données développées dans nos mémoires antérieurs, nous allons reprendre certains faits dont l'étude mérite d'être complétée.

SIGNIFICATION DU HALO. — Si l'on étale sur gélose une suspension microbienne additionnée d'une trace du bactériophage approprié, on obtient, comme on sait, des taches lytiques. Lorsqu'elles sont suffisamment espacées, elles peuvent prendre tout le développement dont elles sont susceptibles et leur aspect peut alors être observé dans les détails. Or, il est connu depuis longtemps qu'autour de la zone claire de lyse la couche microbienne environnante offre parfois un aspect particulier. Sans

être réellement corrodée, elle devient légèrement plus translucide, de sorte que la tache claire s'entoure d'un halo diaphane, déjà visible comme une fine bordure concentrique dès que le gazon microbien se constitue, mais qui, peu à peu, s'élargit dans la suite jusqu'à atteindre parfois une largeur de 2 à 5 millimètres environ. Il est donc évident que de la tache claire se diffuse quelque chose qui modifie sensiblement et jusqu'à une distance assez grande la culture avoisinante. Sertik (1), qui se rallie à la théorie du virus de d'Hérelle, a émis l'hypothèse que ce halo résulterait de la diffusion non pas du virus lui-même, mais d'un ferment élaboré par celui-ci et qui serait l'outil au moyen duquel le virus produit ses effets lytiques.

Cette interprétation de Sertik nous paraît erronée, pour les raisons suivantes :

Le phénomène du halo s'observe nettement lorsque notre bactériophage initial, qui contient les deux principes fort et faible, impressionne sur gélose notre culture totale de *B. coli*, où existent les deux races BS et PR. Mais on démontre aisément que le halo ne se produit pas indifféremment quel que soit le principe et quel que soit le type microbien. En effet, il n'apparaît qu'à l'intervention du type BS et du principe faible. On ne l'observe pas si l'on fait agir le principe fort soit sur le type BS, soit sur le type PR. Or, si l'opinion de Sertik est exacte, comment comprendre que le virus du principe fort, lequel pourtant lyse énergiquement les deux types, soit incapable d'élaborer un ferment lytique analogue à celui que le virus du principe faible sécrète pour lyser le type BS ?

Lorsqu'on utilise la culture de *B. coli* complète et le bactériophage total, le halo peut apparaître pour la raison que la culture complète renferme le type BS et que le bactériophage contient du principe faible. Mais le halo est considérablement plus apparent et mieux développé si l'on emploie, à l'état pur, le principe faible et le type BS. Étalons sur gélose une goutte de culture de ce type ; quelques minutes après, déposons au centre de cette surfaceensemencée une trace de principe faible. En même temps, ensemençons sur gélose le type PR, sans principe. Le soir, après sept ou huit heures d'étuve, le

(1) *Centralbl. f. Bakteriolog.*, 110, 1929, p. 425 ; *C. R. Soc. Biol.*, 104, 1930, p. 4256.

développement est déjà luxuriant. Sur la première gélose, la tache claire marquant l'endroit touché par le principe est fort nette et s'est déjà entourée d'un halo bien perceptible. Examinons les deux tubes par transparence en les plaçant devant une lampe. On sait que la culture BS disperse la lumière, elle apparaît irisée des couleurs de l'arc-en-ciel. Au contraire, la culture PR développée sur la seconde gélose est sans éclat, terne et grisâtre, elle est aussi plus translucide. Or, on constate que sur la première gélose la couche microbienne, envahie par le halo concentrique à la tache claire de lyse, reproduit exactement l'aspect terne, grisâtre et plus transparent de la culture PR de même âge. L'identité est absolue. En dehors du halo, cela va sans dire, le gazon microbien du premier tube, étant du type BS, offre l'aspect brillant et irisé habituel. Il est donc évident qu'au niveau du halo ce n'est point, en réalité, une lyse qui s'effectue. A ce niveau, le type BS subit une influence telle qu'il revêt exactement les caractères de culture du type PR. Or, nous savons que le principe faible agit précisément sur le type BS, de façon à faire apparaître, aux dépens de celui-ci, le type PR.

Seulement, au niveau du halo, cette métamorphose, quoique se dénonçant par le comportement vis-à-vis de la lumière transmise, n'est cependant qu'ébauchée et reste généralement réversible. On peut s'en convaincre en prélevant avec le fil de platine un peu de matière microbienne comprise dans le halo et en l'ensemencant en bouillon. Parfois, la culture ainsi obtenue se développe sous forme de type PR et, dans ce cas, on y retrouve du principe faible en abondance, mais, le plus souvent, on obtient le type BS non modifié, sans principe. En pareil cas, il faut admettre que l'influence tendant à transformer au niveau du halo le type BS en type PR n'a pas été assez puissante pour que ses effets perdurent dans la subculture. C'est d'ailleurs sur le fait que la subculture se révèle exempte de principe que Sertik se fonde pour affirmer que le halo est dû à l'action, non pas du virus qui ne se diffuse pas aussi loin, mais d'un ferment que ce parasite sécrète et qui progresse dans la gélose.

Il n'est évidemment pas possible de démontrer que le principe lytique proprement dit existe au niveau du halo puisque,

en général, il ne se perpétue pas dans la subculture. Toutefois, ce que l'on peut dire, c'est que le halo pourrait contenir du principe sans que celui-ci pût être retrouvé. En effet, l'un de nous a démontré que le bactériophage disparaît sans laisser de traces lorsqu'on le met, à dose très faible, en présence d'un nombre énorme des bactéries sensibles. Or, telles doivent être les conditions réalisées au niveau du halo. Dans cette zone, la multiplication s'est tout d'abord opérée très activement, le principe n'a pu s'y diffuser que plus tard, en quantité naturellement très faible par rapport à l'extrême abondance des microbes néoformés. Dans deux tubes contenant 5 cent. cubes de bouillon et additionnés tous deux d'une très faible dose, un dix-millionième de cent. cube par exemple, de principe faible, introduisons, d'une part une trace d'une suspension épaisse de *B. coli* de type BS, d'autre part plusieurs gouttes de cette même suspension fort opaque. Dans le premier tube, le microbe se convertit en type PR qui pousse en flocons, et l'on trouve que la teneur en principe s'élève considérablement. Dans le second tube, le type BS se maintient, la culture est diffuse et tous les essais tentés en vue d'y retrouver du principe restent négatifs. Il est donc fort admissible qu'au niveau du halo le principe qui a pu s'y diffuser n'est plus récupérable précisément parce qu'il n'y existe qu'en dose infiniment réduite, tandis qu'à cet endroit les microbes sont innombrables. Mais ces traces infimes de principe ont suffi à modifier la culture en lui conférant certaines qualités, révélables par les rayons lumineux, du type PR. Nous allons voir, au surplus, que le principe faible peut produire sur le *B. coli* du type BS des effets spécifiques, même dans des conditions impropres à la régénération du principe, c'est-à-dire lorsqu'on emploie des microbes tués.

AGGLUTINATION DES MICROBES MORTS PAR LE PRINCIPE. — Il est couramment admis que les bactériophages même puissants ne produisent pas d'effet visible sur les microbes tués. Ceux-ci sont rebelles à la lyse et inaptes à la régénération du principe. On connaît assurément des substances capables de lyser des microbes morts, telles que le lysozyme des larmes, du blanc d'œuf ou du lait de femme. Telles sont aussi les sécrétions de

divers streptothrix ou moisissures, ou bien encore les ferments sans doute analogues qui permettent à certaines bactéries de dissoudre des microbes morts de même espèce, ainsi que Gratia l'a constaté en étudiant le staphylocoque. Mais ces principes actifs ne manifestent pas la caractéristique essentielle du bactériophage, à savoir de se régénérer du fait même qu'ils agissent. Rien ne démontre non plus qu'un vrai bactériophage soit en cause dans le cas de lyse signalé par Jaumain. Cet auteur a montré (1) qu'une culture de staphylocoque se lyse lentement mais à peu près complètement si l'on scelle le tube qui la contient, tandis qu'une culture identique reste trouble lorsque le tube n'est pas fermé. Signalons, en passant, que ce phénomène de clarification en atmosphère confinée observé par Jaumain est dû, comme nous avons pu nous en convaincre, à l'accumulation d'acide carbonique. Deux tubes contenant 5 cent. cubes de bouillon sont ensemencés de staphylocoque. Après vingt-quatre heures d'étuve, on fait barboter dans l'un du gaz carbonique, après quoi l'on scelle les deux tubes près de leur extrémité. Il reste ainsi, dans le second tube, une quantité importante d'air, tandis que l'atmosphère intérieure est constituée, dans le premier tube, de gaz carbonique. Au bout de deux ou trois jours, le premier tube s'est presque complètement clarifié, tandis que le second n'a pas sensiblement changé et reste trouble longtemps encore.

Mais pour ce qui est de l'autolyse transmissible, le seul fait établi concernant le comportement des microbes tués consiste en ce que ceux-ci manifestent vis-à-vis du principe un pouvoir absorbant bien appréciable, ainsi que l'ont démontré da Costa Cruz (2), Jaumain et Meulemans (3).

Dans 1 ou 2 cent. cubes de suspension assez épaisse du type BS, tuée par chauffage à 65° ou 80°, introduisons quelques gouttes de principe faible, et portons à l'étuve. Au bout de quelques heures, les microbes se réunissent en flocons qui, le lendemain, se sont condensés au fond du tube, tandis qu'une suspension semblable non additionnée de principe garde son

(1) Autolyse microbienne en tubes scellés. *C. R. Soc. Biol.*, **87**, juillet 1922, p. 790.

(2) Sur la lyse microbienne transmissible (Travail de l'Institut Oswaldo Cruz, 1922).

(3) *C. R. Soc. Biol.*, **87**, juin 1922.

trouble homogène. Chose remarquable, le principe fort ne produit aucunement cet effet.

N'est-il pas curieux de constater que c'est justement et uniquement le principe faible, dont la caractéristique est de transformer le BS à culture diffuse en PR à culture agglutinée, qui précisément jouit de la propriété d'agglutiner les microbes tués du type BS ? Il est superflu d'ajouter que cette agglutination des microbes morts ne s'accompagne pas d'une régénération du principe.

L'agglutination n'est très perceptible que si l'on fait agir une dose assez forte de principe sur une suspension assez concentrée de microbes morts. Le phénomène n'est guère visible si le principe n'est présent qu'à dose faible, à moins, bien entendu, qu'on n'introduise dans la suspension additionnée de cette trace de principe un peu de microbes BS vivants. Dans ce cas, en effet, le principe est régénéré et agit alors à l'état concentré sur les microbes tués. Mais si, dans cette expérience, les microbes vivants mis en jeu appartiennent au type PR, le trouble dû aux microbes morts BS reste diffus (malgré l'apparition d'une culture agglutinable du type PR) car le type PR ne régénère pas le principe faible.

Chauffé à 65°, le principe agglutine encore, mais moins énergiquement que s'il n'a pas été chauffé. Chauffé à 70°, le principe perd son pouvoir agglutinant en même temps que son pouvoir lytique et son aptitude à la régénération. L'agglutination des microbes tués BS par le principe faible se produit en solution physiologique de NaCl, mais non pas en eau distillée.

On peut admettre *a priori* que si les microbes morts BS s'agglutinent sous l'influence du principe faible, c'est qu'ils sont capables de l'absorber. Toutefois, pour que le principe disparaisse complètement du liquide ambiant, il faut n'en mettre en jeu qu'une faible dose et employer une quantité relativement forte de microbes tués. Dans un tube de 5 cent. cubes de bouillonensemencé d'une goutte de culture de type BS, on observe la lyse et la régénération du principe si l'on fait agir celui-ci à dose d'environ 0,0000002 cent. cube. Mais, pour que ces effets se produisent, il faut que le bouillon contienne environ cinq cents fois plus de principe, si, la veille de l'ense-

mencement, on a introduit dans le bouillon, outre le principe, quelques gouttes de suspension opaque de *B. coli* BS tué à 65°. Il y a donc absorption fort appréciable du principe par les bacilles tués. Signalons que cette absorption ne s'observe pas si les microbes morts appartiennent à l'autre type PR. Mais il y a lieu de noter à ce propos que le type PR tué ne semble pas absorber sensiblement non plus le principe fort, lequel d'ailleurs ne paraît pas se fixer davantage sur les bacilles morts du type BS.

Nous nous bornons à ce bref exposé, sans revenir sur la discussion générale des théories de la bactériophagie, pour laquelle nous renvoyons notamment aux Comptes rendus du I<sup>er</sup> Congrès international de Microbiologie. Ajoutons seulement que les intéressantes recherches de Den Dooren de Jong (1), montrant que des spores de certaines races de *B. megatherium*, chauffées à 90° (c'est-à-dire à une température qui détruit sûrement tout bactériophage préformé), fournissent en germant des cultures qui ont gardé leur aptitude première à déclencher la lyse d'autres types de *B. megatherium*, confirment de façon frappante notre théorie autolytique, d'après laquelle les principes sont d'origine bactérienne et interviennent dans la concurrence entre individus microbiens de même espèce ; on y trouve aussi certaines données relatives à la distinction, sur laquelle nous avons insisté (2), entre les pouvoirs lysogènes spontané et induit.

(1) *Proc. Kon. Akad. v. Wetensch.*, **33**, 1930 et **35**, 1932 ; *Centralbl. f. Bakt. Orig.*, **120**, 1931.

(2) *C. R. Soc. Biol.*, **93**, 1925, p. 1054 et *Ces Annales*, 1928.

**RÉSULTATS DE TROIS ANNÉES  
DE VACCINATION ANTIDIPHTÉRIQUE  
PAR L'ANATOXINE DE RAMON  
DANS LA POPULATION SCOLAIRE D'UNE GRANDE VILLE**

par le Dr POULAIN (Saint-Étienne).

Comme dans nombre de grandes villes, la diphtérie existe à Saint-Étienne à l'état endémique, avec de petits foyers épidémiques de quartiers.

La plupart des cas observés à Saint-Étienne sont connus du Bureau d'hygiène pour plusieurs raisons.

Les médecins déclarent volontiers la diphtérie, parce que cette maladie effraye encore la population; parce qu'ils estiment que des mesures efficaces peuvent être prises pour en enrayer l'extension; parce que nous avons insisté auprès d'eux pour obtenir ces déclarations et qu'ils se sont rendu compte de nos efforts; les recherches de porteurs de germes pratiquées autour des malades donnaient un résultat évident.

Beaucoup de malades sont hospitalisés au pavillon des contagieux de l'hôpital; tous ces cas nous sont déclarés. En outre, le transport des malades à l'hôpital n'est assuré que par des ambulances municipales placées sous notre contrôle, et nous sommes avisé du diagnostic d'entrée de tous les malades contagieux.

Le laboratoire du Bureau d'hygiène est utilisé par de très nombreux médecins pour le diagnostic de la diphtérie; nous avons en dépôt, dans tous les postes de police, des boîtes renfermant des tubes de sérum et un écouvillon stérile. Ces boîtes sont à la disposition du public; elles sont délivrées sur simple demande du médecin et portées dans une étuve électrique placée dans le poste central de police. Nous pouvons ainsi donner avant midi de nombreux résultats de culturesensemencées dans la nuit.

Le Service de l'Inspection médicale scolaire fonctionne

avec le concours d'infirmières diplômées, depuis 1921; actuellement, 14 infirmières surveillent l'état sanitaire de près de 20.000 enfants. La plupart des enfants absents de l'école depuis deux ou trois jours sont vus à domicile par une infirmière : au moindre soupçon d'angine, un prélèvement bactériologique est effectué et la réponse donnée le lendemain à la famille; si le résultat est positif, les parents sont invités à faire venir leur médecin. Dès qu'un cas est connu dans une école, l'infirmière fait immédiatement une dizaine de prélèvements, parfois plus, sur les voisins des malades. Nous avons pu ainsi déceler bactériologiquement de nombreux cas de diphtérie avant les symptômes cliniques et permettre au médecin, en présence d'une angine, de faire immédiatement le diagnostic certain, sans avoir à attendre le résultat d'un examen. Le traitement sérique peut être, de cette façon, établi sans retard.

Le tableau I indique le nombre de cas de diphtérie observés, le nombre de décès dus à cette maladie et le nombre de prélèvements effectués dans les écoles, de l'année 1922 à l'année 1931.

TABLEAU I.

ANNÉES	NOMBRE de cas	NOMBRE de décès	MORTALITÉ pour 100 cas	NOMBRE de prélèvements
1922 . . . . .	97	10	10,3	
1923 . . . . .	111	12	10,8	347
1924 . . . . .	98	7	7,1	849
1925 . . . . .	126	9	7,1	597
1926 . . . . .	113	6	5,3	321
1927 . . . . .	63	4	6,3	998
1928 . . . . .	80	2	2,5	951
1929 . . . . .	131	11	8,4	2.159
1930 . . . . .	288	32	11,1	2.573
1931 . . . . .	223	21	9,4	2.326

On voit que si le nombre de cas restait relativement élevé pendant les années 1923 à 1926 (à cause de notre organisation de dépistage qui nous permettait de connaître les cas qui nous seraient demeurés inconnus), la mortalité avait diminué régulièrement et, pendant les années 1927 et 1928, une moyenne de 3 décès sur une population de 35.000 enfants de un à quinze ans semblait indiquer que les mesures de prophylaxie mises en œuvre donnaient un résultat appréciable.

Cependant, dès 1928, dans toute la France était signalée une recrudescence de la diphtérie et une forte augmentation des cas graves et de la mortalité. Nous rendant compte que la prophylaxie par l'isolement et la recherche des porteurs de germes ne pouvait que limiter l'extension d'une épidémie à craindre, nous pûmes obtenir de l'Administration municipale l'autorisation, déjà demandée à plusieurs reprises, de pratiquer sur les enfants des écoles la vaccination antidiphtérique par l'anatoxine de Ramon.

Étant données les difficultés que nous avions eues pour obtenir cette autorisation (des dépêches étrangères malencontreuses avaient signalé à plusieurs reprises des décès à la suite de vaccinations pratiquées par le mélange toxine-antitoxine) et craignant de rendre impopulaire la vaccination si de fortes réactions étaient observées, nous décidâmes de limiter la vaccination aux enfants des écoles maternelles, de deux à six ou sept ans. C'est d'ailleurs à cette période de la vie que la diphtérie présente le plus de gravité et cette façon de faire nous permettait d'espérer obtenir, après cinq ou six années de vaccination, un effectif important de vaccinés dans toutes les écoles, par suite du passage des petits enfants dans les classes primaires.

Nous avons commencé la vaccination au printemps de 1929, après avoir fait une conférence à toutes les institutrices des écoles maternelles; nous leur avons exposé ce qu'étaient la diphtérie, l'immunité, l'anatoxine; nous avons insisté sur l'innocuité de la vaccination et avons sollicité leur concours qui leur était également demandé par M. l'Inspecteur d'Académie. Nous n'avons qu'à nous féliciter de l'aide apportée par le corps enseignant qui a une grosse influence sur les familles des élèves, et nous pouvons dire de suite que quelques institutrices, réfractaires au début, ou tout au moins indifférentes, ayant vu leurs classes plus touchées par la diphtérie que celles d'écoles voisines du même quartier, ont compris l'intérêt de leurs enfants et nous apportent maintenant un concours entier et efficace.

Nous devons signaler aussi que certains médecins ont fait dans plusieurs quartiers une campagne contre la vaccination, et cette opinion médicale, transmise rapidement de bouche en

bouche dans ces quartiers ouvriers, nous a créé quelques difficultés.

Quoi qu'il en soit, nous avons fait un appel à la population par la voie de la presse en faveur de la vaccination; nous avons fait imprimer un tract expliquant ce qu'étaient la diphtérie et l'anatoxine. Ce tract a été distribué à toutes les mamans par les infirmières ou par les institutrices, accompagné d'une feuille d'autorisation à retourner signée. La population stéphanoise en majorité a accepté facilement la vaccination de ses bébés.

Les séances ont eu lieu à l'école : les 8 médecins-inspecteurs ont pratiqué eux-mêmes les injections, avec l'aide de leurs infirmières, des institutrices et des femmes de service, sur les enfants pour lesquels l'autorisation avait été délivrée par les parents.

En outre, une séance publique avait lieu une fois par semaine, à laquelle pouvaient être amenés tous les enfants de n'importe quel âge.

Enfin, les enfants de l'Orphelinat municipal, âgés de sept à treize ans, ont tous été vaccinés.



Au printemps 1929, il a été pratiqué trois injections à trois et deux semaines d'intervalle, aux doses de 0 c. c. 5, 1 cent. cube et 1 cent. cube, soit 25 unités anatoxiques.

A l'automne 1929, il a été pratiqué trois injections aux mêmes intervalles et aux doses de 0 c. c. 5, 1 cent. cube et 1 c. c. 5, soit 30 unités anatoxiques.

A l'automne 1930, mêmes doses, mais un certain nombre de cas de diphtérie ayant été observés chez des enfants vaccinés complètement, nous avons demandé aux parents de laisser pratiquer une quatrième injection de 1 cent. cube, ce qui porte à 35 ou 40 le nombre d'unités anatoxiques; un tract fut adressé à toutes les familles ayant fait vacciner leurs enfants ainsi qu'une formule d'autorisation. Une forte proportion de parents nous répondit favorablement.

A l'automne 1931, à la suite des publications de MM. Ramon, Debré, Mozer et M<sup>lle</sup> Prieur; de Ramon et Nélis attirant l'attention sur l'importance du nombre d'unités anatoxiques injectées,

nous avons utilisé des doses de 1 cent. cube, 2 cent. cubes et 2 cent. cubes, soit 50 unités, et pour les vaccinés à trois injections des années précédentes, la dose de 1 c. c. 5 pour la quatrième injection, portant ainsi à 40 ou 45 le nombre d'unités anatoxiques injectées chez les enfants de cette dernière catégorie.

A la date du 1<sup>er</sup> janvier 1932, il a été pratiqué, chez les enfants, plus de vingt et un mille injections d'anatoxine. Il n'a pas été signalé d'accidents sérieux, la plupart des enfants ne présentant aucune réaction; chez un quart environ, on observe une réaction locale plus intense; un quinzième environ présente une réaction générale avec température dépassant rarement 38° et ne durant pas plus de vingt-quatre heures.

Chez les enfants plus âgés de l'Orphelinat, les réactions générales sont plus fréquentes et sont observées surtout après la deuxième injection.

Chez un seul enfant, la vaccination a été interrompue parce qu'à la suite de la première injection il avait présenté un état lipothymique qui avait duré plusieurs heures, sans qu'il en résulte cependant un état pathologique consécutif quelconque.

\*  
\*  
\*

Dès l'automne 1929, les cas de diphtérie se sont révélés plus nombreux; pendant les années 1930 et 1931, la diphtérie prit dans certains quartiers une allure épidémique; pendant deux ans et demi, la diphtérie se répandit dans la ville, touchant les écoles les unes après les autres, avec un maximum d'acuité pendant les mois de septembre à mai.

Nous avons pu établir des statistiques précises concernant cette épidémie et juger la valeur de la vaccination. Chaque année, nous avons recensé le nombre d'enfants vaccinés et non vaccinés, par âge, et le nombre de cas de diphtérie observés chez les écoliers vaccinés ou non. Nous n'avons tenu compte *que des enfants fréquentant les écoles*, ce qui nous a permis d'établir un pourcentage précis des cas survenus chez les enfants non vaccinés, ou vaccinés à quatre, à trois, à deux ou une injection.

Pour établir la liste des enfants vaccinés au 1<sup>er</sup> janvier de chaque année, nous ajoutons au nombre d'enfants vaccinés

pendant les mois d'octobre à décembre précédents, les enfants vaccinés l'année antérieure en leur donnant dans notre statistique un an de plus. Nous y ajoutons également les enfants vaccinés par leur médecin de famille, quand nous avons pu en avoir connaissance: il est certain que nous avons ignoré un nombre relativement important de ces vaccinations familiales, mais notre statistique n'en a que plus de valeur quant aux résultats qu'elle démontre, puisque nos pourcentages sont rapportés à des chiffres de vaccinés inférieurs à la réalité.

Nous rappelons ce que nous avons exposé plus haut : à savoir que tous les cas de diphtérie survenus dans les écoles sont pratiquement connus par le Bureau d'hygiène, à cause de la surveillance très étroite qu'exercent les infirmières scolaires; aussi, estimons nous que nos statistiques sont sur ce point très près de la réalité. Chaque cas de diphtérie a fait l'objet d'un rapport du médecin-inspecteur des écoles, de l'infirmière, et parfois du médecin traitant.

Ce sont ces statistiques que nous publions ci-après, pour les années 1929, 1930, 1931 et les quatre premiers mois de l'année 1932. Nous avons groupé les enfants en deux catégories : deux à six ans et sept à treize ans; cette division nous a paru rationnelle parce que le nombre et la gravité des cas de diphtérie sont très différents pour ces deux périodes de l'enfance.

..

Après trois années de campagne en faveur de la vaccination antidiphtérique dans les écoles maternelles, 75 p. 100 des enfants fréquentant ces écoles sont vaccinés contre la diphtérie, soit 40 p. 100 ayant reçu de 40 à 50 unités anatoxiques, 23 p. 100 ayant reçu 30 unités et 12 p. 100 ayant reçu de 5 à 15 unités.

Une proportion équivalente de vaccinés à quatre ou trois injections ayant été obtenue l'année précédente, il semble que, en dehors de toute obligation, il soit possible d'amener par des moyens simples de propagande les trois quarts de la population d'une grande ville à faire pratiquer la vaccination chez les petits enfants, à condition toutefois que les séances soient gratuites et mises à la portée de tous, sans dérangement des parents, c'est-à-dire dans les écoles.

TABLEAU II. — Enfants de deux à six ans.

	ENFANTS non vaccinés	ENFANTS vaccinés à 4 injections anciennes ou 3 injections nouvelles 40 à 50 unités	ENFANTS vaccinés à 3 injections anciennes ou 2 injections nouvelles 25 à 30 unités	ENFANTS vaccinés à 2 injections anciennes ou à 1 injection 5 à 15 unités
<i>Année 1929 :</i>				
Nombre . . . . .	4.279		2.330	298
Cas . . . . .	18		3	3
Pour mille . . . . .	4,2		1,3	10
Décès . . . . .	2		0	0
Pour 100 cas . . . . .	12			
Pour 1.000 enfants . . . .	0,47			
<i>Année 1930 :</i>				
Nombre . . . . .	2.730		3.617	544
Cas . . . . .	64		21	7
Pour mille . . . . .	23,4		5,7	13
Décès . . . . .	12		1	1
Pour 100 cas . . . . .	18,43		4,8	14
Pour 1.000 enfants . . . .	4,4		0,29	0,18
<i>Année 1931 :</i>				
Nombre . . . . .	1.637	1.281	2.873	796
Cas . . . . .	49	0	8	5
Pour mille . . . . .	30		2,8	6
Décès . . . . .	9	0	0	1
Pour 100 cas . . . . .	18,1			
Pour 1.000 enfants . . . .	5,5			1,25
<i>Année 1932 (4 mois) :</i>				
Nombre . . . . .	1.758	2.733	1.834	812
Cas . . . . .	16	2	3	2
Pour mille . . . . .	9,1	0,7	1,8	2,4
Décès . . . . .	3	0	0	1
Pour 100 cas . . . . .	18,7			
Pour 1.000 enfants . . . .	1,7			1,23

Dans les écoles primaires, la proportion des vaccinés est de 35 p. 100, mais dans quatre ans, par le simple fait du passage des enfants de l'école maternelle dans les classes des écoles primaires, cette même proportion de 75 p. 100 sera obtenue.

\*  
\* \*

Dans une population scolaire non vaccinée, le nombre de cas de diphtérie observés dans les écoles primaires est de beaucoup

TABLEAU III. — Enfants de sept à treize ans.

	ENFANTS non vaccinés	ENFANTS vaccinés à 4 injections anciennes ou 3 injections nouvelles 40 à 50 unités	ENFANTS vaccinés à 3 injections anciennes ou 2 injections nouvelles 25 à 30 unités	ENFANTS vaccinés à 2 injections anciennes ou à 1 injection 5 à 15 unités
<i>Année 1929 :</i>				
Nombre . . . . .	10.879		300	80
Cas . . . . .	38		1	0
Pour mille . . . . .	3,5		3,3	
Décès . . . . .	0		0	0
Pour 100 cas . . . . .				
Pour 1.000 enfants . . . . .				
<i>Année 1930 :</i>				
Nombre . . . . .	10.014		1.122	163
Cas . . . . .	113		4	1
Pour mille . . . . .	11,3		3,5	6
Décès . . . . .	3		0	0
Pour 100 cas . . . . .	2,6			
Pour 1.000 enfants . . . . .	0,3			
<i>Année 1931 :</i>				
Nombre . . . . .	9.210	792	1.505	310
Cas . . . . .	99	0	8	1
Pour mille . . . . .	10,7		5,3	3
Décès . . . . .	7	0	0	0
Pour 100 cas . . . . .	7			
Pour 1.000 enfants . . . . .	0,76			
<i>Année 1932 (4 mois)</i>				
Nombre . . . . .	7.811	1.842	1.941	473
Cas . . . . .	20	0	3	0
Pour mille . . . . .	2,5		1,5	
Décès . . . . .	1	0	0	0
Pour 100 cas . . . . .	5			
Pour 1.000 enfants . . . . .	0,14			

inférieur à celui qui est observé dans les écoles maternelles. Alors que (d'après Zingher), dans les petites classes des grandes villes, 60 p. 100 des enfants en moyenne présentent une réaction de Schick positive, dans les grandes classes 25 p. 100 seulement sont réceptifs vis-à-vis de la diphtérie. De fait, si l'on compare les cas survenus dans la population scolaire non vaccinée des deux catégories d'enfants, on constate que la morbidité pour 100 enfants est de 2 à 3 fois plus élevée chez les petits que chez les grands.

Mais la vaccination antidiphtérique a modifié profondément les faits habituels; les cas sont maintenant plus nombreux à l'école primaire qu'à l'école maternelle. Chez les enfants de deux à six ans, pendant l'année 1931, la morbidité chez les non vaccinés a été de 30 p. 1.000, alors qu'elle était de 6 p. 1.000 chez les vaccinés incomplètement, de 2,8 p. 1.000 chez les vaccinés à trois, et de 0 chez les vaccinés à quatre injections.

Chez les vaccinés, la plupart des cas ont été très bénins; nous avons pratiqué dans la moitié des cas environ le premier examen bactériologique demandé par le médecin traitant ou par le médecin des écoles; il s'agissait d'enfants présentant une angine blanche ou rouge. Près de la moitié desensemencements ne donnait qu'une culture moyenne, ou peu abondante, dans laquelle on observait, à côté de bacilles diphtériques moyens ou longs, des microbes associés : staphylocoques, pneumobacilles, catarrhalis, bacilles courts pseudo-diphtériques, souvent prédominants. On pouvait se demander s'il s'agissait bien de diphtérie ou d'angine banale chez un porteur de germes. A plusieurs reprises, au reçu de notre réponse, le médecin traitant nous avisait que l'angine était guérie et nous demandait s'il était utile de faire du sérum; nous avons toujours conseillé de pratiquer une ou deux injections de 20 cent. cubes de sérum et nous avons compté ces cas dans notre statistique.

L'autre moitié desensemencements donnait une culture plus ou moins abondante de bacilles diphtériques moyens ou longs, pure ou à peu près pure. Dans ces cas, il s'agissait, en général, d'angine blanche; mais quelques malades étaient également guéris cliniquement quand la réponse était donnée. Dans d'autres cas, le bacille diphtérique ne poussait qu'après quarante-huit ou soixante heures d'étuve.

Chez les enfants dont nous n'avons fait l'examen que quelques jours après la déclaration du médecin traitant, un certain nombre de prélèvements n'ont pas permis de déceler le bacille diphtérique; nous les avons cependant compris dans notre statistique.

Dans l'ensemble, on peut dire que la morbidité par diphtérie a été 15 fois moindre chez les vaccinés que chez les non-vaccinés et que les cas observés ont été en général particulièrement bénins. En particulier, chez les enfants vaccinés à 40 ou

50 unités anatoxiques, la morbidité a été nulle en 1931; en 1932, il a été signalé 2 cas chez ces enfants : chez l'un, le médecin des écoles signale « que l'enfant a guéri spontanément sans sérum »; chez l'autre, décelé à la suite d'un prélèvement prophylactique, le médecin de famille a été appelé parce que l'ensemencement avait donné en seize heures une culture très abondante de bacilles longs, et ce médecin n'a pratiqué une injection de sérum que sur notre demande expresse. Peut-être n'insisterions-nous plus actuellement avec la même conviction à la suite des faits que nous avons observés récemment à l'Orphelinat municipal et que nous rapportons plus loin.

Chez les enfants de sept à treize ans, les résultats de la vaccination sont moins nets : la morbidité, de 11 p. 1.000 chez les non-vaccinés, est de 3 p. 1.000 chez les vaccinés complètement : il n'y a pas eu de cas chez les enfants ayant reçu quatre injections et tous ceux qui ont été observés chez les vaccinés à trois injections ont été bénins; pour ces derniers, il s'agit d'enfants ayant été vaccinés en 1929, avec seulement 25 unités anatoxiques.

\*  
\* \*

La mortalité a été sévère chez les enfants non vaccinés : 18 décès pour 100 cas chez les enfants de deux à six ans, malgré la surveillance étroite des infirmières, le diagnostic précoce dans la plupart des cas, l'existence d'un service de nuit et d'un service hospitalier spécialisé.

Par contre, chez les sujets vaccinés complètement, un seul décès en trois ans sur une moyenne de 4.000 enfants de deux à six ans, soit 1 p. 4.000, alors que pendant le même laps de temps 26 décès survenaient sur une moyenne de 2.000 enfants non vaccinés, soit 52 p. 4.000.

Le décès constaté est survenu chez un petit garçon de quatre ans qui avait reçu, un an auparavant, trois injections d'anatoxine dans des conditions régulières (25 unités seulement); il présenta une forme sévère qui ne céda qu'à 600 cent. cubes de sérum. Il mourut deux mois après le début de sa maladie, avec une forte albuminurie et des accidents cardiaques.

Chez les enfants vaccinés incomplètement, 3 décès ont été constatés en trois ans, sur une moyenne de 700 enfants, soit

17 p. 4.000. Il est à signaler que ces 3 enfants ont contracté la diphtérie un ou deux jours après une injection d'anatoxine. Le premier cas concerne la petite fille J. L..., quatre ans, qui avait reçu une injection de 0 c. c. 5 en mai 1929 et une deuxième de 1 cent. cube en juillet 1929; au début de décembre 1929, sa sœur, non vaccinée, contracte une diphtérie assez bénigne; la fillette, surveillée bactériologiquement pendant tout le mois de décembre (3 examens), n'est jamais trouvée porteur de bacilles. Les parents, sur le conseil du médecin, font pratiquer une troisième injection (1 c. c. 5), le 7 janvier 1930. Le 9 janvier, l'enfant se plaint de la gorge, un prélèvement est effectué alors qu'il n'y a pas encore de fausses membranes. Le lendemain matin, culture abondante de bacilles diphtériques longs; le médecin prévenu trouve une gorge envahie par les fausses membranes en une nuit. Malgré le sérum injecté à hautes doses, la fillette meurt en trois jours.

Les deux autres cas concernent deux enfants, l'un de deux ans, l'autre de trois ans qui ont contracté la diphtérie vingt-quatre à trente-six heures après une deuxième injection d'anatoxine et qui sont morts, l'un huit jours, l'autre quinze jours après le début de la maladie.

Nous avons aussi observé 4 cas de diphtérie survenus de trois à sept jours après une troisième injection d'anatoxine; ces cas ont été bénins. Il est permis cependant de se demander s'il n'existe pas une période d'anergie très courte, vingt-quatre heures à quarante-huit heures environ, suivant les injections d'anatoxine; les 3 cas relatés ci-dessus permettent de poser la question sans d'ailleurs pouvoir la résoudre d'une façon certaine, les cas étant trop peu nombreux.

La mortalité a été beaucoup plus faible chez les grands enfants: en moyenne 5 p. 100 chez les non-vaccinés. Elle a été nulle chez les enfants vaccinés complètement ou incomplètement.

\*  
\* \*

En résumé, chez les jeunes enfants, la vaccination antidiphtérique à 50 unités anatoxiques semble immuniser d'une façon certaine; la vaccination à 25 ou 30 unités immunise une très forte proportion d'enfants: les cas sont de huit à dix fois moins

nombreux que chez les enfants non vaccinés et les cas de décès sont excessivement rares. Les vaccinations incomplètes, de 5 à 15 unités, immunisent un certain nombre de sujets : les cas sont quatre à cinq fois moins nombreux que chez les non vaccinés mais la gravité des cas qui surviennent ne semble que peu influencée par la vaccination. Il n'en saurait être autrement d'ailleurs.

..

Nous voulons également rapporter quelques faits qui, dans un cadre plus restreint, démontrent l'efficacité de la vaccination par l'anatoxine :

1° Groupe scolaire de S... Ce groupe a été créé récemment dans une agglomération de maisons ouvrières nouvellement construites, du type d'habitation collective pour familles nombreuses ; ces maisons sont surpeuplées et les enfants ont des contacts fréquents en dehors de l'école. Les vaccinations avaient eu peu de succès dans ces écoles, quand un foyer épidémique éclata brusquement en mai 1930 : 4 cas en trois jours avec 2 décès. Dans ce petit quartier, la population fut vite alarmée et accepta sans difficulté l'injection de sérum préventif et la vaccination consécutive ; 9/10 des enfants de tous âges furent ainsi immunisés. L'épidémie fut arrêtée de suite et, depuis deux ans, alors que la diphtérie continuait à sévir dans toute la ville, nous n'avons pas constaté un seul cas dans ce quartier.

2° Groupe scolaire de C... Il s'agit également d'un quartier excentrique surpeuplé, dans lequel notre propagande n'avait eu que peu de succès, des conseils étrangers à notre service s'étant opposés à notre action. Dans ce seul groupe, 32 cas se déclarèrent en six mois, dont 19 à l'école maternelle malgré les mesures habituelles de prophylaxie. A la rentrée scolaire suivante, la population accepta la vaccination proposée pour les enfants de tous âges. Depuis dix-huit mois, 2 cas seulement furent constatés chez les non-vaccinés.

3° Ecole maternelle de ... Dans le même quartier, deux écoles maternelles sont situées à 100 mètres l'une de l'autre ; les enfants d'un même immeuble vont les uns dans une de ces écoles, les autres à l'école voisine. Dans l'une d'elles, école n° 1

(150 enfants). la presque totalité des enfants était vaccinée, la directrice ayant insisté auprès des parents en faveur de la vaccination ; dans l'autre école n° 2 (80 enfants), 1/3 à peine des enfants avait reçu de l'anatoxine. Une petite épidémie éclata dans l'école n° 2 en décembre 1930 : 8 cas et 3 décès et 6 porteurs de germes. Dans l'école n° 1, à la même époque, il n'y eut pas un seul cas de diphtérie et, depuis deux ans, 2 cas seulement ont été observés chez les non-vaccinés.

Tous ces faits sont, à notre avis, démonstratifs ; il nous reste maintenant à rapporter ce que nous avons observé à l'Orphelinat municipal et à étudier la question des porteurs de germes.

Nous avons dit plus haut que tous les enfants de l'Orphelinat, 150 garçons et 82 filles de huit à treize ans, étaient vaccinés contre la diphtérie par l'anatoxine et avaient tous reçu 4 injections ou 3 injections de 1 cent. cube, 2 cent. cubes et 2 cent. cubes, c'est-à-dire de 40 à 50 unités anatoxiques.

Tous ces enfants fréquentent le groupe scolaire voisin où ils sont mêlés aux autres enfants des écoles habitant le quartier.

Au début de mars 1932, un cas de diphtérie fut signalé à l'école primaire de filles de ce quartier ; des prélèvements effectués sur les voisines montrèrent que deux fillettes de l'Orphelinat étaient porteuses de bacilles diphtériques longs. A la suite de cette constatation, des cultures d'exsudats pharyngés furent faites pour toutes les pupilles : 44 étaient porteuses de bacilles diphtériques. Quinze jours après, de nouveaux prélèvements ayant été faits, il fut constaté que, sur 38 résultats négatifs au premier examen, 13 étaient devenus positifs et, sur les 44 positifs au premier examen, 23 étaient devenus négatifs. On peut admettre que presque toutes les fillettes ont été, à un moment donné, porteuses de bacilles diphtériques.

Nous avons consigné tous les enfants de l'Orphelinat pendant trois semaines. Entre temps, dans trois classes de l'école de filles, 4 cas bénins de diphtérie s'étaient déclarés et, sur 65 prélèvements de gorge pratiqués sur les élèves du quartier, 14 étaient positifs. Les fillettes de l'orphelinat ont été surveillées de très près, aucun cas d'angine n'a été signalé, il n'a été fait de sérum à aucune et, deux mois après, on n'a constaté aucun accident post-diphtérique.

Des prélèvements furent également pratiqués chez les garçons :

48 d'entre eux étaient porteurs de bacilles diphtériques. Aucune angine ne se déclara. A l'école de garçons un seul cas de diphtérie bénigne fut signalé chez un enfant non vacciné du quartier.

Après trois semaines d'isolement, nous basant sur le décret ministériel du 3 février 1932 qui autorise la présence en classe des enfants vaccinés, nous avons fait réintégrer l'école à tous les enfants de l'Orphelinat et, depuis cette époque (huit semaines), aucune diphtérie n'a été signalée dans le quartier.

Ainsi, dans une école primaire de 250 fillettes, 80 d'entre elles internes de l'Orphelinat, vaccinées et porteuses de bacilles diphtériques en contact avec leurs voisines de classe non vaccinées, n'ont pas créé d'épidémie vraie : 4 cas bénins seulement et, à un moment donné, 20 p. 100 de porteuses de germes parmi les externes.

A l'école maternelle du même groupe, où il existait une forte proportion de vaccinés, il n'y a pas eu de malades.

Il semble que, dans cette observation, la vaccination par l'anatoxine diphtérique à 40 ou 50 unités a protégé d'une façon absolue les 232 enfants de l'Orphelinat dont une forte proportion était porteurs de germes; si l'on songe que ces enfants vivaient en internat, avec des contacts incessants les exposant à une contagion intense, démontrée par le grand nombre de contaminés (porteurs de germes), on ne peut que se féliciter d'avoir pratiqué cette vaccination.

En outre, il est permis de se demander si le bacille diphtérique des porteurs de germes, vaccinés, ne perd pas de sa virulence et ne crée pas chez les voisins de classe non vaccinés un état d'immunité tout au moins relative, et dans certaines conditions. Il semble, d'après plusieurs observations que nous avons faites, que, dans une école vaccinée partiellement, un foyer d'épidémie créé par un porteur de germes vacciné, ne crée qu'un petit nombre de cas de diphtérie bénigne et qu'une immunité d'ensemble soit assez rapidement réalisée. Au contraire, si la diphtérie est importée dans une agglomération par un enfant non vacciné, des cas graves peuvent être observés au début, l'évolution consécutive de l'épidémie est subordonnée à la proportion de vaccinés existant dans cette agglomération, la diphtérie devient d'autant plus rapidement bénigne que la proportion de vaccinés est plus forte. Nous avons observé, en

effet, à plusieurs reprises que les cas étaient plus graves et se succédaient pendant plusieurs mois dans les écoles à faible proportion de vaccinés, alors que les cas étaient bénins, peu nombreux et s'éteignaient rapidement dans les écoles où la proportion des vaccinés était élevée. Il semble que les enfants non vaccinés bénéficient de la vaccination de leurs camarades.

Cependant, si les vaccinés ne semblent guère devoir jouer le rôle d'agents contaminateurs en général, il y a des exceptions : nous venons d'observer une diphtérie sérieuse chez un homme de trente-deux ans, M. I..., père de deux enfants de trois et cinq ans, tous deux vaccinés à 40 unités. A l'occasion de la diphtérie de leur père, nous avons fait des cultures d'exsudats pharyngés de ces deux enfants; tous deux étaient porteurs de bacilles diphtériques longs : ils n'ont pas eu d'angine ni avant ni après leur père, qui est encore actuellement à l'hôpital après un mois de maladie ; il est vraisemblable que cet homme avait été contaminé par ses enfants.

Pour terminer, nous donnons les résultats des recherches des porteurs de germes chez les enfants des écoles, vaccinés ou non. Sur plus de 7.000 prélèvements, effectués entre le 1<sup>er</sup> octobre 1929 et le 31 décembre 1931 (antérieurs à l'épidémie de l'Orphelinat) sur des voisins de malades, nous avons trouvé 216 porteurs de germes répartis de la façon suivante :

	ENFANTS DE	
	2 à 6 ans	7 à 13 ans
Pour 100 enfants non vaccinés . . . . .	3,12	1,47
Pour 100 enfants vaccinés . . . . .	0,65	0,33

Ces chiffres concernent les enfants externes des écoles ; ils n'ont qu'une valeur relative mais paraissent indiquer une diminution nette du nombre des porteurs de germes chez les vaccinés. Nous avons vu que dans un internat, au contraire, la presque totalité des enfants vaccinés peut être contaminée par le bacille diphtérique, sans symptômes cliniques de diphtérie.

Nous avons, jusqu'à présent, éliminé des écoles tous les enfants reconnus porteurs de germes diphtériques qu'ils soient ou non vaccinés. Il semble que les enfants immunisés par l'anatoxine puissent présenter parfois un danger réel ; aussi, avons-nous l'intention de les éloigner de l'école quand ils sont

porteurs de germes, tant que la proportion des enfants vaccinés présents dans les classes n'est pas de 80 p. 100 environ.

#### CONCLUSIONS.

1° La vaccination antidiphtérique par l'anatoxine de Ramon, pratiquée à la dose de 30 unités anatoxiques dans le milieu scolaire d'une grande ville, donne des résultats probants, diminuant dans de fortes proportions le nombre des cas de diphtérie, et surtout leur gravité, mais laisse encore survenir en milieu épidémique un certain nombre de diphtéries bénignes en général.

2° Cette même vaccination, pratiquée à la dose de 40 à 50 unités, en trois ou quatre injections, immunise d'une façon qui, d'après nos essais, paraît certaine.

3° Il est possible, par des moyens simples de propagande, d'obtenir dans les écoles maternelles une proportion de 65 à 70 p. 100 de vaccinés complètement.

4° Les diphtéries survenant dans un milieu partiellement vacciné semblent d'autant moins graves et la durée de l'épidémie paraît d'autant plus courte que le nombre de vaccinés est plus élevé.

5° La vaccination antidiphtérique par l'anatoxine de Ramon est inoffensive chez les enfants des écoles maternelles. Il est à souhaiter que cette vaccination soit rendue obligatoire, en vue d'obtenir une proportion de vaccinés de 80 à 90 p. 100 qui suffirait, semble-t-il, à rendre presque nulle la morbidité diphtérique.

Il serait intéressant également de laisser une trace visible de cette vaccination, point de tatouage très petit, par exemple, les certificats de vaccination se perdant fréquemment, et un certain nombre de familles confondant facilement vaccination, sérothérapie, ou les différentes vaccinations.

6° La vaccination antidiphtérique pratiquée depuis trois ans dans les écoles maternelles de la ville de Saint-Etienne, d'après les chiffres établis ci-dessus, a évité pendant ces trois années plusieurs centaines de cas de diphtérie et plusieurs dizaines de décès; ces résultats sont même au-dessous de la réalité si l'on tient compte des contaminations qui auraient été causées par les cas évités.

## LES RÉSULTATS DE LA VACCINATION PAR L'ANATOXINE DIPHTÉRIQUE EN HONGRIE

par J. TOMCSIK.

*(Travail du service sérologique  
de l'Institut d'Hygiène publique de Hongrie.)*

La vaccination antidiphtérique par l'anatoxine (Ramon) a été largement employée au cours des dernières années. Rien qu'en France, près d'un million et demi d'enfants ont déjà été vaccinés par l'anatoxine. Au Canada, le nombre des enfants vaccinés atteint déjà un million; en Hongrie, 250.000. L'anatoxine a supplanté le mélange de toxine et d'antitoxine même aux États-Unis, du moins pour la vaccination des petits enfants, bien que ce dernier vaccin y ait été utilisé depuis longtemps déjà. Lorsque l'on considère l'extension énorme de l'immunisation active contre la diphtérie, on constate avec surprise, chez certains médecins, une contradiction : d'une part, ils recommandent la généralisation de la vaccination, en se basant sur les résultats obtenus; d'autre part, ils envisagent avec un grand scepticisme l'efficacité de la vaccination et la possibilité des vaccinations en masse. Rappelons la théorie de Friedberger qui a attiré l'attention sur les défauts et l'incertitude des renseignements statistiques. Dans son dernier ouvrage il va jusqu'à douter d'un fait prouvé, tel que la nature antitoxique de l'immunité antidiphtérique!

L'objet de notre présente publication ne consiste pas à exposer notre opinion sur cette « théorie critique », ni à analyser en détails la solidité ou l'insuffisance des travaux statistiques sur ce sujet. Cependant, nous avons trouvé utile d'ajouter à l'étude de ce problème encore incomplètement élucidé quelques données recueillies au cours des récentes campagnes de vaccination en Hongrie.

Pour apprécier l'efficacité de la vaccination, on peut mettre

en œuvre différentes méthodes. Cependant il n'est pas toujours possible de choisir librement entre ces différentes méthodes, car la possibilité d'obtenir les renseignements épidémiologiques nécessaires dépend des conditions locales.

Examinant les résultats des vaccinations contre la diphtérie, pratiquées en Hongrie, nous avons étudié l'influence de la vaccination en masse sur la courbe de la morbidité locale et sur la répartition des cas de maladie selon l'âge. Ces recherches, que nous examinerons en détails, indiquent que dans les arrondissements où l'on a vacciné un grand nombre de sujets appartenant aux groupes les plus sensibles par leur âge à la diphtérie, la courbe de morbidité a montré une chute très nette dès que les vaccinations ont été achevées. Par contre, cette courbe a suivi sa marche régulière habituelle, dans les localités où aucune vaccination ne fut pratiquée. De même, il a été constaté que le pourcentage de morbidité a été moindre dans certains groupes vaccinés qu'on aurait pu le prévoir d'après les statistiques du pays tout entier. Cependant, même à l'aide de ce procédé, on n'a pu préciser exactement, en chiffres, le degré de l'influence de la vaccination par l'anatoxine sur la baisse de la morbidité par diphtérie.

Certes, les résultats des vaccinations peuvent être appréciés avec une grande probabilité en comparant les taux de morbidité chez les sujets vaccinés et chez les sujets non-vaccinés du même âge, habitant la même localité. En théorie, l'emploi de ce procédé paraît facile, mais en pratique il est très compliqué : l'enregistrement séparé des renseignements sur la vaccination, des cas de maladie, et des chiffres dans les groupes de témoins n'est possible que dans les grandes villes, où le service d'hygiène est bien organisé. Ces conditions expliquent peut-être, qu'à l'exception de New-York, de Berlin ou de Toronto, peu de grandes villes peuvent surmonter cette difficulté.

Nous ne connaissons pas l'existence de travaux résumant les résultats de vaccination en masse à la campagne.

Dans un travail publié il y a deux ans, en collaboration avec Johan (1), nous avons déjà signalé la difficulté d'obtenir dans les villages les renseignements nécessaires. Nous n'avons pu

(1) B. JOHAN et J. TOMESIK. *Klin. Woch.*, 9, n° 40, 1930, p. 1869.

juger les résultats de la vaccination dans le département de Szolnok, par exemple, que d'après certains renseignements sur les chiffres en question. Environ 10.000 enfants furent vaccinés par l'anatoxine : le nombre de cas de diphtérie dans ce groupe observés pendant six à huit mois, fut comparé avec celui des enfants de un à quinze ans non-vaccinés; on a observé chez les vaccinés seulement 10 p. 100 de la morbidité constatée parmi les non-vaccinés. L'étude présente porte sur les observations effectuées, pendant une année, sur 100.000 enfants.

Non seulement nous avons préparé le vaccin dans le service sérologique de l'Institut hongrois d'Hygiène, mais nous l'avons nous-même envoyé aux médecins qui ont pratiqué la vaccination. Ce fait nous a considérablement facilité la recherche des renseignements.

Selon notre recommandation, la vaccination fut pratiquée en trois injections sous-cutanées, la première était de 0 c.c. 5 d'anatoxine, la deuxième de 1 c.c. et la troisième de 1 c.c. 5, comme il fut recommandé par G. Ramon. L'intervalle entre les injections était souvent de deux semaines (1), bien que nous ayons recommandé suivant les auteurs français (Ramon, Martin, Loiseau, Lafaille) un intervalle de trois semaines entre la première et la seconde injection.

Nous n'avons envoyé chaque fois qu'une quantité d'anatoxine suffisante pour une injection; l'envoi de la dose suivante n'a eu lieu qu'après réception des renseignements que nous demandions quant au caractère de la réaction vaccinale et quant au nombre et à l'âge des enfants vaccinés. De cette manière, aussitôt après la fin des vaccinations dans diverses localités, nous nous sommes trouvé en possession de chiffres formant la base du matériel statistique. Les registres des noms des enfants vaccinés sont restés également entre les mains des médecins communaux. A la fin de 1931 nous avons pu obtenir du service épidémiologique de l'Institut d'Hygiène de Hongrie des renseignements détaillés sur les cas de diphtérie ayant eu lieu dans les communes où de nombreuses vaccinations avaient été

(1) Ceci explique sans doute la légère différence observée entre les pourcentages de sujets immunisés (réaction de Schick négative) en Hongrie et en France.

pratiquées. Nous avons reçu de la sorte des renseignements concernant 21 villes et plus de 200 communes : pour contrôler et compléter ces renseignements nous les avons envoyés aux médecins civils. Ces derniers ont pu indiquer, d'après leurs registres, les cas de diphtérie survenus en 1931 parmi les vaccinés ainsi que le nombre et les dates d'injections d'anatoxine qu'ils ont reçues. Nous avons réussi également à obtenir les renseignements sur le cours de la maladie chez les sujets vaccinés.

Nous ne rapportons pas dans ce mémoire les résultats d'environ 20.000 vaccinations effectuées à Budapest ; nos collègues Born et Braunnhoffner feront prochainement sur ce sujet une communication détaillée. Il faut noter qu'à un certain point de vue il est plus facile d'émettre des conclusions sur les résultats des vaccinations dans les villages, bien que les renseignements soient plus difficilement obtenus. Dans les grandes villes, en effet, les vaccinations sont faites durant toute l'année, de sorte que le nombre des sujets vaccinés et celui du groupe témoin varient toujours. Par contre, à la campagne, les médecins communaux entreprennent les vaccinations autant que possible simultanément à certaines époques, chez tous les enfants réceptifs, et par conséquent le nombre de vaccinés et celui de sujets du groupe témoin restent longtemps invariables.

L'âge et le nombre des sujets vaccinés dans le même groupe sont variables suivant les départements et suivant les villes. Par conséquent, on ne peut pas étudier l'ensemble de résultats de la vaccination dans le pays entier, c'est pourquoi nous rapportons les résultats séparément, par départements et par villes.

1<sup>o</sup> DÉPARTEMENT DE SZOLNOK. — Ce département est le premier où la vaccination antidiphtérique fut pratiquée de façon systématique chez les élèves des écoles primaires. Au printemps 1929, 10.000 élèves furent vaccinés au moyen de la triple vaccination dans l'espace de quelques mois. Les vaccinations ont continué en automne et au printemps 1930 ; vers la fin de 1930 le nombre d'enfants vaccinés a dépassé le chiffre de 20.000. Il faut noter que la totalité de la population du département atteint 387.225 ; par conséquent le nombre de sujets vaccinés était relativement bas. Aussi l'influence de la vaccination ne

pouvait guère être nette. Pourtant on constate un fléchissement caractéristique de la courbe de la morbidité dans ce département. Le nombre de cas de maladie dans le département de Szolnok était en 1928 relativement très élevé; sous ce rapport ce département occupait la quatrième place. En 1930 la morbidité fut nettement réduite et le département n'occupait à ce point de vue que la dix-septième place (sur 25).

Johan et Tomcsik (1) ont exposé en détails l'efficacité de la vaccination pratiquée dans ce département au printemps 1929. Ils ont constaté que le taux de morbidité par diphtérie chez les enfants non-vaccinés était de 3,85 p. 1.000, tandis que chez les enfants immunisés par la triple injection d'anatoxine il était de 0,39 p. 1.000 pendant une période de six à dix mois.

Dans la présente étude nous tiendrons compte seulement des cas de maladie observés au cours de 1931; pour simplifier notre exposé nous ne ferons aucune différence entre la vaccination de 1929 et celle de 1930. Nous possédons des renseignements sur 5 villes et 30 communes de ce département, le chiffre de la population y atteint 286.454. Vers la fin de 1930 le nombre d'enfants ayant reçu trois injections d'anatoxine était de 20.109, c'est-à-dire 7 p. 100 de la population.

362 cas de diphtérie ont eu lieu au cours de l'année dans les 5 villes et 30 communes ci-dessus citées, il y eut donc 126 cas pour 100.000 habitants. Le chiffre de morts de diphtérie était 36, c'est-à-dire 10,3 p. 100 des cas de maladie.

Par contre, parmi les enfants vaccinés complètement, 14 seulement ont été atteints de diphtérie, c'est-à-dire 67 p. 100.000 habitants, bien que ces enfants appartenissent par leur âge à la catégorie (cinq à dix ans) sensible à la diphtérie. Cette différence doit être considérée comme très importante, puisque environ 90 p. 100 des vaccinations ont été effectuées chez les enfants de cinq à dix ans, c'est-à-dire dans la catégorie qui paie le plus large tribut à la diphtérie (près de la moitié des cas). Le taux de morbidité chez les enfants vaccinés et celui chez les non-vaccinés ne peuvent être véritablement comparés que si l'on connaît le nombre des enfants non-vaccinés du même âge et le nombre de cas de maladie dans ce groupe. Nous avons pu

(1) B. JOHAN et J. TOMCSIK. *Klin. Woch.*, J. 9, 1930, p. 1869, 1871.

constater, d'après les renseignements envoyés à l'Institut d'Hygiène de l'État, que parmi les enfants de cinq à dix ans non-vaccinés il y a eu 154 cas de diphtérie dont 10 mortels. Par ailleurs, il nous fut assez difficile d'établir le nombre exact d'enfants non-vaccinés. Pourtant on peut trouver ce nombre approximativement en le calculant d'après la statistique de la population du pays entier : 14 p. 100 de la population appartiennent au groupe d'enfants âgés de cinq à dix ans ; par conséquent, on peut supposer que le nombre total d'enfants dans le département dont nous parlons est de 40.400. En déduisant le chiffre de vaccinés, nous obtenons approximativement le nombre de non-vaccinés, qui atteint 20.000 d'après ce calcul. Parmi ceux-ci il y eut 154 cas de maladie, c'est-à-dire 770 p. 100.000. En se basant sur ces considérations, nous arrivons à la conclusion, *que le nombre d'enfants atteints par la diphtérie était, dans le groupe d'enfants de cinq à dix ans non-vaccinés, dix fois plus élevé que, pendant la même période de temps, dans le groupe d'enfants du même âge, vaccinés trois fois par l'anatoxine.*

Nous sommes arrivé à cette conclusion en calculant les chiffres du groupe témoin d'après la statistique du pays entier. Cependant, nous sommes convaincu que ces chiffres correspondent à la réalité ; même si les chiffres du pays entier n'étaient pas proportionnels aux chiffres de ce département à cause du mouvement de la population, la petite correction à faire modifierait très peu les résultats.

Les vaccinations ont été continuées dans le département de Szolnok en 1934 ; 1.699 enfants furent vaccinés ; il s'agissait pour la plupart d'élèves de l'école primaire. Dans notre rapport nous les avons considérés comme non-vaccinés pour éviter une erreur en faveur des résultats de la vaccination.

En analysant les chiffres de morbidité par diphtérie, on peut constater quelques anomalies dans certaines communes, bien que la courbe de morbidité présente une régularité très nette. Le taux de morbidité dans les communes était en moyenne de 126 par 100 000 habitants ; dans certaines communes il varie quelque peu. Seule, en particulier, était anormale la morbidité très élevée dans la commune de Kenderes ; elle y était de 564, donc 4 1/2 fois plus élevée que la morbidité moyenne, bien que

731 enfants sur 5.850 habitants (12,5 p. 100 de la population) eussent été vaccinés. En 1929, plus de 30 cas de diphtérie se déclarèrent dans cette commune; en 1930, 9 cas; en 1931, le nombre des cas atteignit 33. D'après les renseignements du médecin communal, un seul cas sur ces 33 appartient au groupe des vaccinés, pour tous les autres il s'agissait d'enfants non immunisés habitant les fermes voisines.

2° DÉPARTEMENT DE NOGRAD-HONT. — La mise en œuvre et la réalisation de la vaccination contre la diphtérie furent conduites de même façon que dans le département de Szolnok. Depuis 1924-1925, le nombre de cas de diphtérie s'éleva chaque année; en 1929, ce département occupa, en ce qui concerne la morbidité, le dixième rang avec ses 289 cas de maladie. Ce fait a obligé le médecin-inspecteur à introduire la vaccination; elle n'était pas limitée aux élèves des écoles, mais s'étendait aussi aux enfants de l'âge préscolaire de deux à six ans. Vers la fin de 1930 le nombre d'enfants vaccinés trois fois s'élevait à 14.435: vers la fin de 1931 il atteignait 17.719. En calculant le taux de vaccinés par rapport à la population totale (206.722 d'après le recensement de 1920), 7 p. 100 de la population totale furent vaccinés contre la diphtérie vers la fin de 1931. Étant donné que la vaccination fut pratiquée presque uniquement chez les enfants de deux à huit ans, on peut admettre que 50 p. 100 des enfants les plus réceptifs étaient immunisés contre la diphtérie.

On pouvait donc prévoir que la vaccination de 50 p. 100 des enfants les plus sensibles à l'infection, au moment où l'épidémie est sur le point d'atteindre son maximum, se traduirait par un changement notable du taux de morbidité de la population; cependant, nous nous rendons compte que le trajet régulier de la courbe épidémique est relativement peu influencé quand il s'agit de la statistique d'une grande région. En réalité le phénomène prévu a eu lieu. En effet, le chiffre de morbidité dans ce département était, en 1931, moins élevé que dans tous les autres départements, alors que pendant des années, avant la vaccination, ce département occupa, d'après son chiffre de morbidité par diphtérie, la dixième place dans le pays.

Ces considérations prouvent déjà le succès des vaccinations

réalisées dans ce département; ce succès devient encore plus manifeste si l'on considère séparément les cas de maladie dans deux villes ou dans les divers arrondissements de ce département. Les chiffres comparatifs sont exposés dans le tableau suivant. On observe nettement le rapport entre le nombre de vaccinations et le chiffre de morbidité malgré les oscillations locales de cette dernière.

TABLEAU I.

VILLE OU ARRONDISSEMENT	VACCINÉS 3 FOIS			CHIFFRE de morbidité	
	En 1930	En 1931	Pourcentage de la population		
Ville de Balassagy . . . . .	334		2,93	430	107
Ville de Salgotarjan . . . . .				300	
Arrondissement de Salgotarjan . .	4.344	961	4,3	48	
Arrondissement de Szecheny . . .	969	757	3,3	18	
Arrondissement de Szirak . . . .	651	402	1,8	110	56
Arrondissement de Balassagy . .	2.483	538	10,3	92	
Arrondissement de Nograd . . . .	4.454	297	16,9	27	
Arrondissement de Szob . . . . .	1.766	263	10	34	
Arrondissement de Vamossikola .	2.234	66	20	91	
	14.435	3.284			

On voit d'après ce tableau que le chiffre de morbidité atteignit le maximum dans la ville de Salgotarjan où les vaccinations n'ont pas eu lieu.

Par contre le chiffre de morbidité était le plus faible dans l'arrondissement de Nograd, où 17 p. 100 de la population, c'est-à-dire presque tout le groupe de la population enfantine de deux à huit ans, furent vaccinés. On observe des exceptions locales; par exemple, dans l'arrondissement de Vamossikola, 20 p. 100 de la population furent vaccinés et cependant le chiffre de morbidité était de 91. Dans les districts où la vaccination a eu lieu sur une grande échelle, le chiffre moyen de morbidité était de 56, tandis que dans les districts non-vaccinés il était de 107.

Le succès des vaccinations dans ce département est encore plus net si on compare le taux de morbidité chez les enfants vaccinés (3 injections) avec celui des enfants de même âge

non-vaccinés ou n'ayant reçu qu'une injection. Vers la fin de 1930, 14.435 enfants furent vaccinés dans cet arrondissement au moyen de la triple injection. En 1931, 4 enfants de ce groupe ont présenté une diphtérie atténuée (27,7 par 100.000). D'après la statistique générale du pays, le nombre d'enfants de un à neuf ans dans ce département est de 39.690. Après déduction du nombre des enfants ayant reçu 3 injections d'anatoxine, le nombre d'enfants non-vaccinés ou vaccinés partiellement approche 25.225. Au cours de 1931 on a observé parmi ceux-ci 125 cas de diphtérie (534 sur 100.000).

*Ainsi les résultats des vaccinations dans les départements de Nograd-Hont sont encore plus favorables que ceux de Szolnok : puisque, parmi les enfants non-vaccinés, les cas de maladie étaient vingt fois plus nombreux que parmi les enfants immunisés au moyen de la triple injection d'anatoxine.*

3<sup>e</sup> DÉPARTEMENT DE KOMAROM-ESZTERGOM. — Dans ce département on a commencé les vaccinations antidiphtériques en octobre 1930 seulement. Cependant, au bout de deux mois, 34.306 enfants étaient déjà vaccinés par l'anatoxine. Ce nombre comprend à peu près 90 p. 100 d'enfants de deux à dix ans. La préparation et l'organisation de cette vaste campagne de vaccination ont été mises en œuvre par le médecin-inspecteur du département, le D<sup>r</sup> L. Sajo. Ses efforts furent largement secondés par les fonctionnaires; ils aboutirent grâce à l'esprit d'initiative des médecins praticiens. La pratique des vaccinations représentait en effet pour les médecins un problème jusqu'à un certain point difficile; cependant cette entreprise fut couronnée de succès.

Le résultat des vaccinations est déjà évident si l'on s'en rapporte aux chiffres de la morbidité par diphtérie dans cet arrondissement en 1931; le taux des cas de diphtérie a baissé de 49 p. 100, comparativement à celui de l'année précédente.

Dans les autres départements, le taux de cas de maladie était plus élevé.

En 1931, 204 cas de diphtérie furent constatés dans le département d'Esztergom-Komarom possédant 166.728 habitants. On nota quelques cas parmi les sujets vaccinés. Vers la fin de 1931, 30.102 enfants furent vaccinés dans cet arrondissement au

moyen de la triple injection d'anatoxine; 47 enfants de ce groupe tombèrent malades au cours de 1931; moins de 10 p. 100 d'enfants de deux à dix ans étaient ou non-vaccinés ou incomplètement vaccinés par une ou deux injections; sur ce nombre, 67 sont tombés malades en 1931.

*Ces chiffres montrent que les cas de diphtérie étaient, dans ce département, au moins dix fois plus nombreux parmi les sujets non-vaccinés que parmi ceux qui reçurent trois injections d'anatoxine.*

La statistique, en ce qui concerne la morbidité, démontre la nécessité de la triple injection. Sur 4.204 enfants qui n'ont reçu qu'une ou deux injections jusqu'à la fin de 1930, 21 sont tombés malades au cours de 1931, c'est-à-dire 500 par 100.000. Parmi les enfants immunisés au moyen de la triple injection d'anatoxine le coefficient de morbidité était seulement de 153.

\*  
\* \*

En dehors des trois départements dont nous avons parlé ci-dessus, l'immunisation en masse contre la diphtérie fut aussi pratiquée dans le *département de Pest*. Le nombre d'enfants vaccinés était ici de 25.000. Ce nombre est sensiblement moindre par rapport à la population de Pest (plus de 1.000.000) que le nombre des vaccinés dans un département moins peuplé, à Nograd par exemple. Les résultats dans les autres départements où les vaccinations furent moins nombreuses encore correspondent à ceux que nous avons rapportés ci-dessus; nous ne pouvons les exposer en détails.

Nous citerons seulement comme exemple des résultats de la vaccination dans les villes ceux observés à H.-Vasarhely, où le nombre d'enfants vaccinés était plus élevé qu'ailleurs. Environ 5.558 élèves, c'est-à-dire plus de 90 p. 100 des enfants âgés de six à quatorze ans, furent immunisés dans cette ville qui possède près de 60.000 habitants. En outre, 700 enfants moins âgés y furent vaccinés avant la fin de 1930. L'année précédente le nombre de cas de diphtérie à H.-Vasarhely était de 97. En 1931, après la fin de la vaccination, ce nombre a baissé jusqu'à 45. Sur 5.550 enfants de six à quatorze ans, 6 seulement ont présenté des signes de diphtérie au cours de 1931. Le cours de la

maladie était remarquablement atténué et sans suite fâcheuse, alors que sur 39 cas d'enfants non-vaccinés 5 eurent une issue mortelle. L'efficacité de la vaccination est aussi bien prouvée par le fait suivant : sur 300 enfants de six à quatorze ans non-vaccinés, 7 sont tombés malades de la diphtérie, c'est-à-dire un nombre plus grand que sur les 5.550 enfants du même âge immunisés avec l'anatoxine.

\*  
\* \*

*L'objet principal des recherches sur l'efficacité des vaccinations par l'anatoxine était d'établir le degré de la diminution du nombre de cas de maladie chez les enfants vaccinés. Pendant une année nous avons poursuivi le sort de 100.000 enfants vaccinés de nombreuses villes et communes. En résumant nos observations, nous pouvons constater que le nombre de cas de maladie chez les vaccinés représente 1/10 seulement du nombre qu'on aurait pu prévoir d'après l'observation du groupe témoin. Par conséquent, l'influence de la vaccination se traduit par une réduction de 90 p. 100 du taux de la morbidité. Nous sommes convaincu que ces résultats suffisent à prouver l'efficacité et la nécessité des vaccinations.*

\*  
\* \*

On peut se demander quelle forme revêt la maladie chez les enfants atteints malgré la vaccination.

Nous avons pu obtenir des renseignements sur 102 cas de maladie chez des sujets ayant reçu trois doses d'anatoxine. Ce chiffre comprend presque tous les cas de maladie ayant eu lieu parmi 100.000 vaccinés pendant une période de un an. Les cas de maladie sont apparus dans les intervalles suivants après la troisième injection :

	POURCENTAGE de cas de maladie
Après 1 à 2 mois . . . . .	8
Après 2 à 6 mois . . . . .	20
Après 6 à 12 mois . . . . .	26
Après 1 à 2 ans . . . . .	40
Après 2 à 3 ans . . . . .	5

La répartition des sujets malades d'après l'âge était la suivante :

	POURCENTAGE
0 à 2 ans . . . . .	6
3 à 4 ans . . . . .	23
5 à 6 ans . . . . .	21
7 à 8 ans . . . . .	36
9 à 10 ans . . . . .	8
11 à 12 ans . . . . .	7

Nous avons noté l'âge des malades afin de pouvoir tirer des conclusions sur le degré de la maladie. Les nombres exprimés en pourcentage ne donnent bien entendu aucune explication quant aux faits observés parmi les enfants du même groupe. De plus, le nombre précis de vaccinés appartenant au même groupe d'âge est loin d'être connu dans toutes les localités où ont été observés des cas de maladie. Dans 86 p. 100 des cas, la maladie atteignit des enfants au-dessous de huit ans. Dans ce groupe le cours de la diphtérie chez les vaccinés est généralement plus grave que chez les enfants plus âgés et il faut prévoir de nombreux cas graves avec environ 10 p. 100 de mortalité. Par contre, chez 102 enfants vaccinés trois fois, la diphtérie se présentait de la manière suivante :

	POURCENTAGE
Cas atténués . . . . .	75,5
Cas moyens . . . . .	16,5
Cas de croup . . . . .	4
Cas d'infection mixte . . . . .	1
Cas toxiques . . . . .	2,9
Cas mortels . . . . .	2,9

Les médecins traitants ont désigné par le terme « atténués » les cas où l'état général n'était pas sensiblement influencé, où la température n'était que modérément élevée et où aucun symptôme ne s'était déclaré après dix jours. Nous rangeons également dans ce groupe les cas de maladie au cours atypique, guéris en quelques jours même sans traitement sérothérapique. Les résultats de l'examen bactériologique n'étaient pas toujours positifs. Cependant nous n'avons pas voulu exclure le diagnostic de diphtérie, lorsque le médecin traitant observait la formation de fausses membranes typiques. D'après les publications de divers auteurs, chez les sujets vaccinés trois

fois le cours de la maladie est nettement atténué. Nous pouvons confirmer cette opinion, puisque 75 p. 100 de cas observés par nous présentèrent un cours atténué. Cependant, nous ne pouvons pas confirmer les observations antérieures sur l'absence de cas mortels de diphtérie parmi les sujets vaccinés trois fois par l'anatoxine : on a en effet observé en Hongrie 3 cas d'infection mortelle plus d'un mois après la vaccination, c'est-à-dire au moment où l'effet de la vaccination aurait dû être bien développé. Pourtant, 2 des cas de mort ne peuvent être absolument rapportés à la diphtérie, puisque, selon l'examen clinique, la mort était provoquée par une infection mixte. Dans ces deux cas (W. M..., six ans, Felsogalla et T. F..., sept ans, Katymar) malgré l'existence de pseudomembranes typiques sur les amygdales, les résultats de l'examen bactériologique étaient négatifs. Pourtant, le troisième cas ne semble pas douteux. Nous rapportons ici ce cas d'après les renseignements mis très aimablement à notre disposition par le Dr J. Rogrűn :

T. M..., âgé de six ans, vacciné trois fois par l'anatoxine diphtérique en octobre-novembre 1930 (valeur antigène de la préparation était de 10 à 12 unités par centimètre cube). Tombé malade le 25 novembre 1931. Le 28 novembre, transporté à l'hôpital à [Dorog. L'amygdale droite est couverte d'une large membrane grise, les ganglions cervicaux sont gonflés; température 37°8. Injection de 20.000 unités antitoxiques. Le 30 novembre, son état est aggravé, les symptômes locaux restent sans changement. Une autre injection de 10.000 unités d'antitoxine. L'urine contient de l'albumine en abondance; frottis du pharynx — diphtérie — positifs. Aucune amélioration pendant les jours suivants. Le 4 et le 5 décembre : injection de dextrose. Le 6 décembre : poulx difficilement palpable, respiration nasale, vomissement, spasmes; camphre, caféine, strychnine, dextrose. Mort à 8 heures du soir.

Ce cas attire notre attention sur le fait qu'après la vaccination on doit prévoir un certain pourcentage de vaccinés qui ne sont pas immunisés ou le sont insuffisamment. Il est bien connu que même une triple injection d'anatoxine ne provoque pas toujours, chez certains sujets, l'apparition d'antitoxine en quantité suffisante. Nous sommes convaincu que l'immunité de l'organisme vis-à-vis de la diphtérie est assurée par un certain taux d'antitoxine et par la faculté de produire l'antitoxine; nous comprenons donc que, chez certaines personnes, même trois injections d'anatoxine ne parviennent pas à provoquer

une immunité suffisante. D'après nos propres constatations (1), par exemple, 90 à 92 p. 100 des sujets vaccinés présentent après vaccination une réaction de Schick négative; 8 à 10 p. 100 des vaccinés restent donc réceptifs à la maladie.

Influence de l'immunisation active  
au moyen de l'anatoxine  
sur la courbe de morbidité par diphtérie  
et sur la répartition selon l'âge des cas de cette maladie.

Les oscillations des épidémies de la diphtérie, telles qu'on les observe d'après les courbes de morbidité, diffèrent, malgré leur régularité apparente, sur plusieurs points. Bien que les oscillations saisonnières soient les mêmes pour divers pays, il y a des différences dans la périodicité de la morbidité par diphtérie, ainsi que dans les courbes dressées pour la durée d'un siècle. Par exemple dans certains pays, les périodes d'ondes épidémiques sont séparées par des intervalles de quatre à six ans; ces derniers peuvent cependant varier dans la courbe d'un siècle: de plus, dans d'autres pays, les ondes de la morbidité n'atteignent leur point culminant qu'à des intervalles de douze à quatorze ans.

En Hongrie, les observations épidémiques sur ce sujet datent de 1884; jusqu'aujourd'hui nous avons pu observer 4 ondes croissantes, à des intervalles de douze à quatorze ans. Le premier maximum (1891) était considérablement plus élevé que dans les ondes suivantes: le maximum de la dernière onde (1930) était un peu plus élevé que celui de l'avant-dernière (1916). Par conséquent, les observations des oscillations épidémiques de la diphtérie en Hongrie, faites jusqu'à présent, ne permettent qu'une approximation très limitée dans les pronostics épidémiologiques que l'on peut tirer des conclusions relatives au trajet de la courbe et au moment probable de son point culminant et de son niveau le plus bas. Mais puisque la loi des oscillations durant un siècle n'est pas encore connue, on ne peut prévoir même approximativement ni la valeur

(1) J. TOMCSIK, Rapport au Comité d'Hygiène de la S. D. N. C. H., 1931

*Annales de l'Institut Pasteur*, t. XLIX, n° 5, 1932.

absolue d'un point de la courbe, ni la hauteur précise de ces points maximum et minimum.

Existe-t-il une possibilité quelconque d'apprécier le succès d'une immunisation antidiphtérique, en observant et en comparant les intervalles correspondants des ondes épidémiques avant et après la vaccination?

Les observations faites jusqu'à présent ne permettent pas toujours des conclusions convaincantes. Par exemple, aux Etats-Unis, où les premières vaccinations antidiphtériques sur une vaste échelle ont eu lieu, le nombre de cas de diphtérie a considérablement baissé après l'introduction de vaccinations en masse. Cependant, le nombre de cas de maladie a baissé également dans les nombreuses villes où l'on n'appliquait la vaccination que sur une petite échelle ou pas du tout. Il était difficile de conclure dans ce cas, puisque le moment des vaccinations en masse coïncidait avec le maximum de la courbe diphtérique. Un travail de Godfrey (1), publié récemment, montre, d'une manière claire, que la courbe de morbidité baisse brusquement dans les villes américaines où l'on a vacciné au moins 30 p. 100 d'enfants de un à cinq ans, âge où ils sont plus sensibles à la diphtérie. Par contre, on n'a observé cette baisse qu'exceptionnellement dans les localités où aucune vaccination n'avait été appliquée, ou bien dans les localités où seuls les élèves des écoles primaires furent vaccinés.

La courbe de morbidité par diphtérie a atteint son maximum en Hongrie en 1930-1931 : cependant les premières vaccinations avaient eu lieu dès la fin de 1928. Nous avons donc pu tirer nos conclusions sur les résultats de la vaccination antidiphtérique au moment où la courbe de morbidité atteignit son maximum, ce qui n'avait pu être réalisé dans les autres pays. Nous espérons, par conséquent, que nos observations, bien que publiées peu de temps après la vaccination, présentent un certain intérêt.

Avant de rechercher les rapports entre la vaccination et la morbidité par diphtérie, nous avons considéré comme nécessaire d'examiner la courbe de la morbidité diphtérique dans divers départements et villes. Nous avons pu y constater la

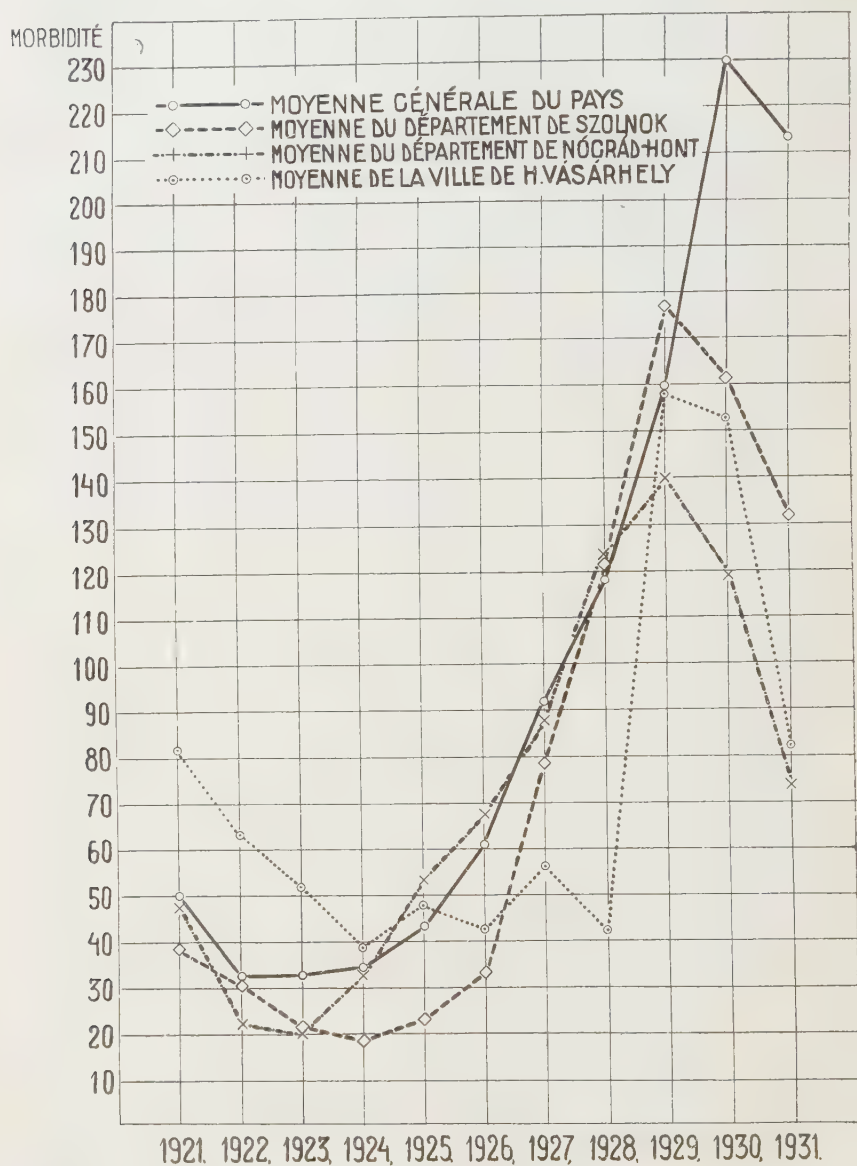
(1) *American J. of Public Health*, 22 237 1932.

même régularité que dans la courbe de morbidité pour l'ensemble du pays. En utilisant les renseignements indiqués, nous avons classé les cas de diphtérie depuis 1921 d'après les départements et les villes, puis calculé pour chaque région le coefficient pour 100.000 habitants. Dans la figure annexée à ce mémoire, le schéma des épidémies dans l'ensemble du pays est représenté sous forme d'une courbe. Les chiffres correspondants relatifs aux départements et aux villes n'y sont pas cités afin d'abréger l'exposé. Cependant, ces chiffres ont permis de constater un parallélisme très net entre la courbe de morbidité dans différentes régions et celle dans le pays tout entier. Un seul département au nord du pays faisait exception : le nombre de cas de maladie y était très bas et il atteignit son maximum trois ans avant que la courbe du pays entier eût atteint le sien. La régularité frappante de la marche des épidémies dans les 24 départements et les 11 villes permet, à notre avis, d'attribuer aux vaccinations pratiquées les variations ultérieures de la courbe de morbidité observées dans les départements vaccinés.

Dans un groupe de villes et de départements, le maximum de cas de maladie fut atteint en 1930, dans un autre en 1931. La courbe de morbidité atteignit son maximum plus rapidement dans une ville et deux départements où les vaccinations avaient été appliquées largement. Nous donnerons ici un bref résumé indiquant les dates et la fréquence des vaccinations par l'anatoxine par les départements et les villes ci-dessus mentionnés : ce résumé nous permettra d'apprécier l'effet des vaccinations prophylactiques sur la courbe de morbidité.

Dans le département de Szolnok, au début de 1929, 19.000 enfants furent immunisés par l'anatoxine, les vaccinations ont continué durant toute l'année. Au début de 1930, 20.000 enfants de un à dix ans, dont 50 p. 100 de même âge, ont reçu trois injections d'anatoxine. Il faut ajouter à ce nombre 3.000 à 4.000 enfants ayant reçu seulement une ou deux injections d'anatoxine. Le nombre des enfants de un à cinq ans vaccinés dans ce département fut relativement bas. En 1930, après la vaccination, une baisse du nombre de cas de diphtérie fut observée. Bien que peu marquée, cette baisse doit être retenue, puisque dans toutes les autres localités où la vacci-

nation en masse n'a pas eu lieu, le nombre de cas s'accrut.



Dans le département de Nógrád-Hont, la campagne de vaccination générale ne commença qu'au printemps 1930 : cepen-

dant, elle obtint un tel succès que, dans plusieurs localités, tous les enfants de deux à huit ans furent vaccinés par l'anatoxine diphtérique au cours d'une période de temps très brève. Vers la fin de l'année, 40 p. 100 des enfants de un à neuf ans furent vaccinés. L'effet de cette large application de la vaccination se fit remarquer dans le cours de la même année : le nombre de cas de diphtérie baissa par rapport au coefficient de 1929. On continua les vaccinations en 1931, et la baisse de morbidité fut encore plus marquée.

A la même époque, la vaccination antidiphtérique par l'anatoxine fut mise en œuvre sur une assez grande échelle dans la ville de H.-Vasarhely. Au printemps de 1930, 2.260 enfants y furent vaccinés; en automne, 3.517 enfants, la plupart de six à dix ans (plus de 90 p. 100 des enfants de ce groupe d'âge). L'influence de la vaccination sur la courbe annuelle de morbidité est également très marquée : au début de l'année, le nombre de cas de maladie était encore plus élevé qu'en 1929; il a baissé en été au niveau de l'année précédente et augmenta de nouveau au début de l'automne; cependant, après les vaccinations effectuées au début de l'automne, le maximum habituel d'automne ne fut pas atteint, la courbe de morbidité baissa et oscilla autour des chiffres d'été. Cette chute eut également son influence sur le nombre total de cas de maladies en 1930; celui-ci fut moins élevé que le faisait prévoir la morbidité des années précédentes.

La figure représente la courbe de morbidité dans les départements de Szolnok et de Nograd-Hont et dans la ville de H.-Vasarhely, elle illustre le parallélisme qui existait jusqu'au moment de vaccination en masse, entre la courbe de morbidité dans le pays entier et les courbes de ces régions : ensuite, au lieu de l'élévation observée sur la courbe générale du pays, on constate une descente très marquée de ces courbes des départements et la ville de H.-Vasarhely.

La vaccination par l'anatoxine ne fut entreprise sur une échelle aussi grande dans aucun département non plus que dans aucune ville. Il est donc impossible d'expliquer par une simple coïncidence le fait que le nombre de cas de diphtérie a baissé seulement dans les localités où fut vacciné un pourcentage relativement élevé.

Ce qu'il faut remarquer surtout, c'est la régularité de la courbe de morbidité dans diverses localités du pays. Les observations durant les dix années qui vont venir confirmeront, sans doute, d'une manière plus convaincante encore, nos conclusions, si toutefois les vaccinations annuelles sont continuées à la même échelle. Déjà, les observations faites à l'heure actuelle montrent que les vaccinations contre la diphtérie, faites sur une échelle suffisante, peuvent modifier la courbe de morbidité par diphtérie, en l'abaissant.

Les vaccinations furent continuées en Hongrie, sur une échelle plus vaste encore, au moment où la morbidité était à son point culminant dans le pays (seconde moitié de 1930 et première partie de 1931). Avant la fin de 1931, 200.000 enfants ont été immunisés en Hongrie contre la diphtérie. La campagne de vaccination a réussi surtout dans les départements de Komarom et de Esztergom, où 90 p. 100 de tous les enfants de deux à huit ans furent immunisés contre la diphtérie. Ces vaccinations furent terminées en décembre 1930 ; par conséquent, on pouvait s'attendre dans ces départements à une modification sensible de la courbe de morbidité par diphtérie.

C'est ce qui eut lieu en effet : le nombre de cas de diphtérie dans les départements de Komarom et d'Esztergom a baissé (de 1930 à 1931, de 49 p. 100 ; dans les autres départements où le maximum avait été atteint en 1930, cette baisse variait entre 1 à 20 p. 100 ; dans deux départements elle était de 30 p. 100.

*L'ensemble de ces observations nous permet la conclusion suivante : En Hongrie dans les départements où la vaccination par l'anatoxine a été appliquée sur une grande échelle, la courbe de morbidité par diphtérie, considérée par rapport au moment de l'immunisation, a commencé à baisser plus rapidement et d'une manière plus brusque que dans les départements où la vaccination n'a pas été pratiquée.*

A notre connaissance, le changement qui s'opère grâce à la vaccination dans la répartition de la maladie selon l'âge n'avait pas encore été examiné en tant que preuve de l'efficacité des vaccinations antidiphtériques. Cependant, l'étude de ce problème est possible puisque la vaccination est souvent limitée aux groupes d'enfants d'un certain âge. Dans certaines localités, seuls les élèves des classes inférieures des écoles primaires

se trouvent vaccinés ; dans les localités où la vaccination a été entreprise sur une vaste échelle, les enfants de deux à huit ans ont été en très grande majorité vaccinés. En conséquence, on doit s'attendre à ce que, dans les départements vaccinés, les cas de diphtérie fussent moins fréquents parmi les enfants du même âge vaccinés et cela indépendamment du « génie épidémique ». En particulier, on peut s'attendre à cette alternative dans les départements où sont vaccinés au moins 50 p. 100 des enfants ayant le même âge. Nous avons examiné à ce point de vue les statistiques des départements où les vaccinations ont été appliquées sur une échelle suffisante chez les enfants de trois à huit ans. On sait que, d'ordinaire, les cas de diphtérie sont plus nombreux dans ce groupe que dans l'ensemble de tous les autres groupes réunissant les enfants plus ou moins âgés. Les chiffres obtenus sont résumés dans le tableau suivant :

TABLEAU II.

DÉPARTEMENT	POURCENTAGE de sujets vaccinés par rapport à la population	RÉPARTITION de cas de diphtérie p. 100	
		3 à 8 ans	0 à 2 ans et au-dessus de 9 ans
Pest P. S. Kk. . . . .	2,3	60	40
Nograd-Hont. I. . . . .	2,7	62	38
Nograd-Hont. II . . . . .	13,8	43	57
Komarom-Esztergom . . . . .	20,6	49	51

Il est évident, d'après ce tableau, qu'à peu près 60 p. 100 des cas de diphtérie, chez les enfants âgés de trois à huit ans, appartiennent aux départements où au moins 2 à 3 p. 100 de la population ont été immunisés. Par contre, moins de 50 p. 100 des cas de diphtérie étaient observés parmi les enfants dans les départements de Nograd-Hont et de Komarom-Esztergom où les enfants de cet âge furent vaccinés dans une grande proportion. Bien que les différences ne soient pas considérables, ces chiffres indiquent que la sensibilité vis-à-vis de la diphtérie se trouve abaissée dans le groupe des enfants vaccinés du même âge. Cette méthode de renseignements peut être recommandée

comme pratique pour toutes vaccinations mises en œuvre ailleurs, puisque l'information sur la répartition selon l'âge peut être facilement obtenue.

### Résumé.

Actuellement, en Hongrie, 250.000 enfants ont été vaccinés par l'anatoxine de Ramon. D'après la morbidité totale en 1931, nous avons pu constater le succès de l'immunisation dans plusieurs départements où plus de 50 p. 100 d'enfants furent vaccinés. Nous avons observé 100.000 enfants vaccinés correctement, depuis 1930 jusqu'à la fin de 1931, et nous avons constaté que la morbidité par diphtérie a montré dans ce groupe une diminution de 90 p. 100 par rapport à la morbidité chez les enfants de même âge et de la même localité non-vaccinés. Les cas de maladie survenus chez les sujets vaccinés présentèrent pour un haut pourcentage d'entre eux un cours atténué ; cependant, on a observé quelques cas graves, avec 3 cas mortels parmi les enfants ayant reçu trois injections. La rareté de ces cas sévères, parmi les enfants vaccinés, justifie la conclusion que la baisse de la mortalité par diphtérie chez les enfants immunisés dépasse considérablement 90 p. 100.

Les observations concernant la vaccination antidiphtérique en Hongrie que nous venons de relater montrent que certains renseignements épidémiologiques, facilement obtenus et sûrs, peuvent être mis à profit pour apprécier le succès d'une méthode de vaccination telle que celle à l'anatoxine.

# CONTRIBUTION A L'ÉTUDE EXPÉRIMENTALE DU BACILLE BILIÉ DE CALMETTE ET GUÉRIN (BCG)

par L. NÈGRE  
(en collaboration avec J. VALTIS).

(*Institut Pasteur. Laboratoire de recherches sur la tuberculose*).

Nous exposons dans ce travail les résultats de nouvelles recherches que nous avons poursuivies sur la fixité des caractères d'atténuation du BCG, sur l'action *in vivo* des matières grasses sur le BCG, sur les éléments filtrables de ce germe, sur l'influence de l'absorption intestinale du BCG chez les animaux préalablement infectés avec un bacille virulent, et sur l'immunisation locale.

## Fixité des caractères d'atténuation du BCG.

Nous avons déjà constaté avec Boquet [1] que deux souches de BCG ayant subi, l'une 300 passages, l'autre 377 passages sur milieu bilié, se comportent de manière identique au point de vue de leur pouvoir antigène *in vitro* et *in vivo* et de leur activité chez l'animal. Nous en avons conclu que, depuis les expériences initiales de Calmette et de ses collaborateurs, les caractères du BCG ne se sont modifiés ni dans le sens d'une récupération partielle de virulence, ni dans le sens d'une atténuation plus marquée.

M. Calmette ayant reçu d'un laboratoire étranger (1) une souche de BCG qui, d'après son détenteur, ne se serait plus comportée comme la souche de BCG originelle, nous avons fait une étude comparative de cette souche et de la souche BCG ayant subi 418 passages sur bile.

(1) Laboratoire du BCG de l'Institut d'Hygiène publique de l'État Tchécoslovaque à Prague.

## 1° INOCULATION INTRAPÉRITONÉALE.

EXPÉRIENCE. — Le 27 novembre 1931, 1 cobaye reçoit dans le péritoine 1 milligramme de BCG (souche Vanicek).

Sacrifié le 29 janvier, il présente 3 petits nodules épiploïques non caséux, dans lesquels on ne trouve pas de bacilles acido-résistants.

A la même date, 1 cobaye reçoit dans le péritoine 10 milligrammes de la souche BCG Vanicek.

Sacrifié le 19 février 1932, il présente 3 petits ganglions mésentériques légèrement hypertrophiés dans lesquels on ne trouve pas de bacilles.

EXPÉRIENCE. — Le 24 décembre 1931, 3 cobayes reçoivent dans le péritoine 1 milligramme de BCG (souche Vanicek).

Sacrifiés le 5 février 1932, ils présentent un cordon épiploïque légèrement épaissi et 2 ou 3 petits ganglions mésentériques légèrement hypertrophiés dans lesquels on ne trouve pas de bacilles.

A la même date, 3 cobayes reçoivent dans le péritoine 10 milligrammes de BCG (souche Vanicek).

Un cobaye est sacrifié le 2 février 1932. Il présente 2 nodules épiploïques, gros comme un petit pois et un grain de blé, non caséux, contenant des bacilles acido-résistants.

Les deux autres sont sacrifiés le 5 février 1932. Ils présentent chacun deux nodules épiploïques non caséux et 2 ou 3 petits ganglions mésentériques légèrement hypertrophiés dans lesquels on ne trouve pas de bacilles acido-résistants.

Pour comparaison on procède aux expériences suivantes :

EXPÉRIENCE. — Le 24 décembre 1931, 3 cobayes reçoivent dans le péritoine 1 milligramme de BCG (418° passage sur bile). Les 3 cobayes sacrifiés le 24 février 1932 présentent, l'un aucune lésion, le second un gros nodule mésentérique de la grosseur d'un petit pois dont le pus contient des bacilles acido-résistants; le troisième a un petit ganglion mésentérique hypertrophié non caséux, dans lequel on ne trouve pas de bacilles acido-résistants.

A la même date, 3 cobayes reçoivent dans le péritoine 10 milligrammes de BCG (418° passage sur pomme de terre biliée).

Un meurt le 22 janvier 1932 sans lésions. Le 5 février 1932, les deux autres cobayes sont sacrifiés. L'un n'a aucune lésion, l'autre présente un cordon épiploïque épaissi, contenant quelques petits nodules, non caséux, dans lesquels on ne trouve pas de bacilles acido-résistants.

*Après inoculation intrapéritonéale au cobaye de 1 et 10 milligrammes de la souche BCG Vanicek et de la souche BCG 418° passage sur bile, les formations péritonéales transitoires observées ont été sensiblement les mêmes.*

## 2° ÉTUDE DU POUVOIR SENSIBILISANT A LA TUBERCULINE.

Les deux souches BCG Vanicek et 418° passage Paris sont inoculées le 26 janvier 1932 à la dose de 0 milligr. 001,

0 milligr. 0001 et 0 milligr. 00001 sous la peau de deux cobayes pour chaque dose et chaque souche. Ces animaux ont été, quatre semaines après, éprouvés à la tuberculine par intradermo-réaction. Le 19 février 1932, les 2 cobayes, qui ont reçu sous la peau 0 milligr. 001 BCG (souche Vanicek), réagissent positivement à une injection intradermique de 0 c. c. 01 de tuberculine brute. Des 2 cobayes qui ont reçu sous la peau 0 milligr. 0001 de BCG (souche Vanicek), l'un réagit faiblement à la tuberculine, l'autre ne réagit pas. Les 2 cobayes qui ont reçu sous la peau 0 milligr. 00001 de BCG (souche Vanicek) ne réagissent pas à la tuberculine. Les 2 cobayes qui ont reçu sous la peau 0 milligr. 001 de BCG 418<sup>e</sup> passage sur bile réagissent positivement à une injection intradermique de 0 c. c. 01 de tuberculine brute. Les 2 cobayes qui ont reçu sous la peau 0 milligr. 0001 de BCG 418<sup>e</sup> passage sur bile réagissent faiblement à la tuberculine. Les 2 cobayes qui ont reçu sous la peau 0 milligr. 00001 de BCG 418<sup>e</sup> passage sur bile ne réagissent pas à la tuberculine.

*Les deux souches se sont donc comportées de façon identique au point de vue de leur effet sensibilisant vis-à-vis de la tuberculine chez le cobaye.*

*A la dose de 0 milligr. 001 elles ont sensibilisé cet animal; à la dose de 0 milligr. 0001 elles l'ont sensibilisé faiblement et irrégulièrement et à la dose de 0 milligr. 00001 elles ne l'ont apparemment pas sensibilisé (du moins vis-à-vis de la dose de tuberculine employée par nous).*

### 3<sup>e</sup> ÉTUDE DU POUVOIR ANTIGÈNE *in vivo*.

3 cobayes ont reçu le 24 décembre 1932 dans le péritoine : deux 10 milligrammes de BCG (418<sup>e</sup> passage sur bile) et un 10 milligrammes de BCG (souche Vanicek). Ils sont saignés le 22 janvier 1932. En présence d'antigène méthylique, le sérum de l'un des deux premiers cobayes a été négatif, celui des deux autres a fixé une dose d'alexine.

## Action *in vivo* des matières grasses sur le bacille bilié.

(En collaboration avec J. VALTIS.)

L'un de nous a constaté avec Boquet [2] que les injections sous-cutanées d'extraits acétoniques de bacilles de Koch sont capables de hâter l'évolution des lésions des animaux tuberculeux, et que les injections sous-cutanées d'huile d'olive exercent la même action en favorisant la multiplication des bacilles [3]. Le bacille BCG étant caractérisé, comme l'a montré Albert Berthelot, par une teneur en matières hydrocarbonées très inférieure à celle des bacilles tuberculeux virulents de type humain ou bovin, on pouvait se demander si l'introduction de substances ciro-grasseuses spécifiques comme celles extraites du bacille tuberculeux par l'acétone, ou de matières grasses telles que l'huile d'olive dans l'organisme d'animaux inoculés avec de fortes doses de BCG, ne permettrait pas de faire récupérer à ce germe une partie de sa virulence.

EXPÉRIENCE. — Le 14 octobre 1930, 11 cobayes reçoivent sous la peau de l'aine droite 10 milligrammes de BCG (394<sup>e</sup> passage sur milieu bilié du 25 septembre 1930). Deux d'entre eux sont conservés comme témoins. Les 9 autres sont traités par des injections sous-cutanées bi-hebdomadaires de 1 cent. cube d'extrait acétonique de bacilles de Koch. Du 28 octobre au 10 novembre, 3 cobayes traités meurent avec une légère hypertrophie de leurs ganglions inguinaux et sous-lombaires droits, dans lesquels on ne trouve pas de bacilles acido-résistants.

4 cobayes traités meurent du 12 novembre au 30 décembre avec les mêmes ganglions légèrement hypertrophiés et contenant des bacilles acido-résistants. Les ganglions du cobaye mort le 30 décembre sont broyés et inoculés sous la peau de 9 cobayes.

Le 31 décembre les injections d'extrait acétonique sont arrêtées. Le 5 janvier et le 2 février 1931, les deux cobayes traités survivants meurent avec une légère hypertrophie de leurs ganglions inguinaux droits, qui contiennent quelques bacilles acido-résistants. Les deux témoins meurent le 21 janvier et le 16 avril sans hypertrophie ganglionnaire.

Parmi les 9 cobayes inoculés avec les ganglions du cobaye mort le 30 décembre, 5 sont traités par des injections d'extrait acétonique de bacilles de Koch et 4 sont conservés comme témoins. 4 traités meurent prématurément d'infections intercurrentes dans le premier mois après l'inoculation et sans lésions. Le survivant, sacrifié le 7 mars, présente dans l'aine droite un ganglion légèrement hypertrophié contenant quelques bacilles acido-résistants. 2 témoins meurent également quelques jours après l'inoculation. Les deux autres survivent un mois et présentent un ganglion inguinal droit légèrement hypertrophié (lentille) et contenant quelques bacilles acido-résistants.

Dans une seconde série d'expériences, 11 cobayes sont inoculés le 30 octobre 1930 sous la peau de l'aîne droite avec 10 milligrammes de BCG (395<sup>e</sup> passage sur milieu bilié du 13 octobre). 2 sont conservés comme témoins. Les 9 autres reçoivent deux fois par semaine en injections sous-cutanées 1 cent. cube d'huile d'olive stérilisée.

Les 13 et 27 novembre, un cobaye traité et un témoin meurent avec une légère hypertrophie des ganglions inguinaux droits, qui contiennent des bacilles acido-résistants. Trois autres cobayes traités meurent les 28 novembre, 7 et 8 décembre avec leurs ganglions inguinaux et sous-lombaires droits légèrement hypertrophiés et contenant des bacilles acido-résistants. Le 26 décembre, les injections d'huile sont suspendues. Le 31 décembre, 2 cobayes traités sont sacrifiés; leurs ganglions inguinaux et sous-lombaires droits légèrement hypertrophiés contiennent des bacilles acido-résistants. Le second cobaye témoin, sacrifié à la même date, ne présente aucune hypertrophie ganglionnaire. Le 26 janvier 1931, un cobaye traité meurt. Son ganglion sous-lombaire droit est légèrement hypertrophié, mais on n'y trouve pas de bacilles acido-résistants. Le 16 avril, les deux derniers cobayes traités sont sacrifiés. L'un n'a pas d'hypertrophie ganglionnaire; chez l'autre le ganglion sous-lombaire droit est légèrement hypertrophié, mais ne contient pas de bacilles acido-résistants.

*On peut conclure de ces expériences que si les injections sous-cutanées d'extrait acétonique de bacilles de Koch ou d'huile d'olive à des cobayes inoculés sous la peau avec de fortes doses de BCG paraissent favoriser légèrement la multiplication de ces bacilles dans les ganglions de ces animaux, elles ne se sont pas montrées capables de rendre à ce germe sa virulence originelle.*

### Mise en évidence d'éléments filtrables dans le BCG et innocuité de ces éléments.

(En collaboration avec J. VALTIS.)

A la suite de nos expériences qui ont établi l'influence active que des injections sous-cutanées d'extrait acétonique de bacilles de Koch à des cobayes préalablement inoculés avec les éléments filtrables du virus tuberculeux exercent sur la reprise de virulence des bacilles issus de ces derniers, nous avons étudié l'action de ces extraits sur les cobayes inoculés avec des filtrats de cultures de BCG.

EXPÉRIENCE. — Le 5 septembre 1930, 5 cobayes sont inoculés sous la peau de l'aîne droite avec 10 cent. cubes de filtrat sur bougie Chamberland L<sub>1</sub>, d'une culture de BCG sur milieu synthétique de Sauton, âgée de sept jours. 3 sont traités par des injections bi-hebdomadaires d'extrait acétonique de

bacilles tuberculeux et reçoivent, du 6 septembre au 28 octobre, 17 injections de ce produit. 2 sont conservés comme témoins. Parmi les traités, un cobaye (A), sacrifié le 18 novembre, présente à droite deux ganglions inguinaux et un ganglion sous-lombaire fortement hypertrophiés, *contenant des bacilles acido-résistants*. Un autre cobaye (B), sacrifié le 7 janvier 1931, n'a qu'une légère hypertrophie de ses ganglions inguinaux dans lesquels on ne peut pas mettre en évidence des bacilles acido-résistants.

Les deux animaux témoins meurent le 20 novembre 1930 et le 8 janvier 1931. Ils ne présentent aucune hypertrophie ganglionnaire et aucune lésion.

Les ganglions du cobaye A sont réinoculés le 18 novembre sous la peau de l'aîne droite de 6 cobayes. 3 sont traités par des injections bi-hebdomadaires d'extract acétonique de bacilles de Koch et 3 sont conservés comme témoins.

Les cobayes traités meurent : un, le 28 novembre, sans hypertrophie ganglionnaire; le second, le 24 décembre, avec un ganglion inguinal droit hypertrophié, *contenant des bacilles acido-résistants*; le troisième, le 22 avril 1931, avec une légère hypertrophie de ses ganglions inguinaux et sous-lombaires droits dans lesquels nous ne pouvons pas découvrir de bacilles acido-résistants. Réinoculés à une autre série de 3 cobayes, ces derniers ganglions n'ont provoqué l'apparition chez ces animaux d'aucune lésion ganglionnaire. Les trois témoins meurent les 28 novembre et 1<sup>er</sup> décembre 1930 et le 22 avril 1931, sans aucun changement dans l'état de leurs ganglions.

Les ganglions du cobaye B sont réinoculés le 7 janvier 1931 sous la peau de l'aîne droite de six cobayes. Trois meurent du 23 janvier au 1<sup>er</sup> février, deux sans lésions, un avec un ganglion inguinal droit hypertrophié, *contenant des bacilles acido-résistants*. Les trois derniers sont sacrifiés le 1<sup>er</sup> mai 1931, un seul présente une hypertrophie de ses ganglions inguinaux et trachéo-bronchiques qui *contiennent des bacilles acido-résistants*. Ces ganglions sont réinoculés sous la peau de quatre cobayes qui meurent du 19 mai au 11 juin sans présenter de bacilles acido-résistants dans leurs ganglions.

*Nous avons donc pu démontrer qu'il existe dans le BCG des éléments filtrables. Ceux-ci ont été mis en évidence après des injections de substances ciro-graisseuses du bacille de Koch chez les cobayes inoculés sous la peau avec des filtrats sur bougie Chamberland L<sub>2</sub> de cultures de BCG. Mais, alors que chez les cobayes inoculés avec des filtrats de bacilles virulents, nous avons observé sous l'influence des injections d'extract acétonique de bacilles de Koch une reprise de virulence des bacilles acido-résistants qui en dérivent, nous n'avons constaté aucun fait semblable chez les cobayes qui ont reçu par voie sous-cutanée du filtrat de BCG et qui ont été traités de la même façon. Les bacilles ont disparu au troisième passage.*

Nous devons ajouter que de Sanctis Monaldi [5] a pu également démontrer l'existence d'éléments filtrables dans le BCG par inoculation intraganglionnaire au cobaye de filtrats de cultures de ce germe sur bougie Chamberland L<sub>2</sub>.

**Effets de l'absorption par voie digestive de bacilles BCG chez des cobayes préalablement infectés avec un bacille tuberculeux virulent.**

La pratique du BCG a montré qu'on pouvait, sans aucun inconvénient, revacciner à plusieurs reprises par la voie buccale des enfants présentant une réaction positive à la tuberculine. Il était néanmoins intéressant d'étudier expérimentalement l'effet de l'absorption de fortes doses de BCG chez des animaux préalablement infectés par la voie oculaire ou par la voie intestinale avec un bacille virulent.

EXPÉRIENCE. — Le 18 janvier 1932, 10 cobayes reçoivent par instillation sur la conjonctive 0 milligr. 5 de la souche bovine Vallée. Le 8 février suivant, tous les cobayes sont éprouvés par injection intradermique de tuberculine. Deux seulement réagissent positivement, mais faiblement. Le 19 février, nouvelle épreuve : tous réagissent positivement.

Le 20 février et les trois jours suivants, on fait ingérer à 5 des précédents cobayes 1 centigramme de BCG chaque fois, soit au total 4 centigrammes. 5 cobayes sont conservés comme témoins.

Les 22 et 23 février, deux des cobayes qui avaient absorbé le BCG et un témoin meurent. Leurs ganglions cervicaux étaient hypertrophiés.

Un autre cobaye, qui avait ingéré le BCG, meurt à la fin de mars. Ses ganglions cervicaux hypertrophiés et caséux contiennent des bacilles de Koch. Ses ganglions trachéo-bronchiques sont hypertrophiés; les poumons et le foie sont indemnes de toute lésion; la rate est augmentée de volume, mais sans granulations.

Le 7 avril, tous les cobayes survivants sont sacrifiés.

L'un de ceux qui avaient absorbé le BCG a des ganglions cervicaux caséux, légèrement plus volumineux que ceux des témoins. Ses ganglions trachéo-bronchiques sont hypertrophiés; les poumons et le foie sont sains; sur la rate on trouve 5 granulations. L'autre cobaye qui avait ingéré le BCG a des ganglions cervicaux caséux du même volume que ceux des témoins. Les ganglions trachéo-bronchiques sont hypertrophiés; les poumons sont indemnes. Le foie présente quelques rares tubercules; ceux-ci sont plus nombreux sur la rate.

À la même date, les cobayes témoins ont leurs ganglions cervicaux hypertrophiés, caséux et leurs ganglions trachéo-bronchiques sensiblement de même volume que ceux des cobayes précédents. L'un d'eux présente de nombreuses lésions tuberculeuses du foie et de la rate. Deux cobayes ont d'assez nombreuses lésions spléniques, le quatrième 5 ou 6 tubercules sur la rate.

EXPÉRIENCE. — 10 cobayes ingèrent les 20, 21 et 22 janvier 1932 1 milligramme de la souche bovine Vallée chaque fois, soit au total 3 milligrammes de bacilles virulents. 1 cobaye meurt d'infection intercurrente le 29 janvier.

Le 19 février, les 9 cobayes survivants sont éprouvés par injection intradermique de tuberculine. 7 réagissent positivement, deux ne réagissent pas.

Le 20 février, 5 cobayes (3 à réaction positive, 2 à réaction négative) ingèrent, ainsi que les trois jours suivants, 1 centigramme de BCG, soit au total 4 centigrammes. 4 cobayes sont conservés comme témoins.

Le 4 mars, 1 cobaye, qui a absorbé le BCG, et 2 cobayes témoins meurent avec une simple hypertrophie de leurs ganglions mésentériques.

Le 6 avril, les 4 cobayes survivants, qui ont ingéré le BCG, sont sacrifiés. Leurs ganglions mésentériques hypertrophiés sont du même volume que ceux des cobayes témoins. L'un a de nombreuses lésions du foie et de la rate; ses poumons sont indemnes. Le second a de rares tubercules sur la rate, plus nombreux sur le foie, aucune lésion des poumons. Le troisième présente quelques rares tubercules spléniques, le foie et les poumons sont indemnes. Le quatrième a de nombreux tubercules sur la rate, quelques tubercules sur les poumons; le foie est indemne.

Les 2 cobayes témoins survivants sont sacrifiés à la même date. Leurs ganglions mésentériques hypertrophiés ont les mêmes dimensions que ceux des cobayes précédents. L'un présente de nombreux tubercules sur le foie; ils sont plus rares sur la rate et les poumons. L'autre a des tubercules rares sur le foie et les poumons, très nombreux sur la rate.

*Chez les cobayes infectés par voie intestinale, de même que chez ceux infectés par voie oculaire avec des bacilles virulents, l'ingestion de 4 centigrammes de BCG, un mois après l'infection virulente, n'a provoqué aucune aggravation des lésions, ni aucune modification de l'aspect de celles-ci.*

#### Vaccination du cobaye au BCG par la voie péritonéale et épreuve virulente par la même voie.

La résistance des cobayes prémunis par le BCG à une infection d'épreuve déterminée par un bacille virulent a été constatée par de très nombreux auteurs. Comme nous l'avons nous-même montré avec Calmette et Boquet [6], chez les cobayes prémunis avec le BCG par voie sous-cutanée ou par voie vasculaire, l'infection d'épreuve, réalisée par inoculation sous la peau ou par instillation conjonctivale de bacilles virulents, évolue bien plus lentement que chez les témoins et se montre beaucoup plus bénigne. Dans ces expériences déjà anciennes, nous avons cru constater que la voie péritonéale était une voie d'immunisation moins favorable que la voie sous-cutanée et que la voie vasculaire. Mais les animaux prémunis par injection intrapéritonéale de BCG étaient alors éprouvés par la voie

oculaire ou la voie sous-cutanée. A la suite d'expériences telles que celles de C. Ninni [7] et de J. Vallis et F. Van Deinse [8] qui ont essayé de réaliser une immunité locale par injection intradermique de BCG au cobaye et au lapin, nous avons tenté d'éprouver par la voie péritonéale des cobayes qui avaient reçu l'injection prémunisante de BCG par la même voie.

EXPÉRIENCE I. — Le 10 décembre 1931, 6 cobayes reçoivent dans le péritoine 10 milligrammes de BCG. Le 22 janvier 1932, ils sont éprouvés, ainsi que 6 témoins, par inoculation intrapéritonéale de 0 milligr. 0001 de la souche bovine Vallée. Deux cobayes prémunis et un témoin meurent prématurément



FIG. 1. — Cobayes de l'expérience I prémunis par injection intrapéritonéale de 10 milligrammes de BCG et éprouvés par inoculation intrapéritonéale de 0 milligr. 0001 de la souche bovine Vallée. A, rates des prémunis; B, rates des témoins.

de pasteurellose; un cobaye prémunis et un cobaye témoin sont sacrifiés le 6 février. Tous deux ont des ganglions mésentériques hypertrophiés, mais, alors que le prémunis n'a pas d'hypertrophie de ses ganglions sous-lombaires, le cobaye témoin présente des ganglions sous-lombaires fortement hypertrophiés, contenant des bacilles de Koch.

Le 18 février, les trois cobayes survivants prémunis et les quatre témoins sont sacrifiés.

Les lésions péritonéales des cobayes prémunis sont moins prononcées que celles des témoins. Leurs ganglions sous-lombaires et mésentériques et leurs nodules épiploïques sont moins volumineux que ceux des non prémunis. Mais les cobayes prémunis se distinguent surtout des cobayes témoins par une absence complète de lésions hépatiques et presque complète de lésions spléniques. Ils n'ont que 2 ou 3 tubercules sur la rate dont

le volume est resté normal, alors que les témoins présentent de nombreuses lésions sur cet organe hypertrophié et quelques granulations sur le foie.

EXPÉRIENCE II. — 5 cobayes reçoivent dans le péritoine, le 24 février 1932, 10 milligrammes de BCG. Le 29 mars, ces animaux et 5 cobayes neufs sont inoculés par voie péritonéale avec 0 milligr. 0001 de la souche bovine Vallée.

Un cobaye prémuni et deux témoins meurent prématurément. Les survivants, 4 prémunis et 3 témoins, sont sacrifiés le 20 avril 1932.

Comme dans l'expérience précédente, les lésions péritonéales des cobayes prémunis sont moins marquées que chez les cobayes témoins. Les ganglions mésentériques et sous-lombaires et les nodules épiploïques sont plus hyper-



FIG. 2. — Cobayes de l'expérience II prémunis par injection intrapéritonéale de 10 milligrammes de BCG et éprouvés par inoculation intrapéritonéale de 0 milligr. 0001 de la souche bovine Vallée. A, rates des prémunis; B, rates des témoins.

trophés chez ces derniers. Les cobayes prémunis n'ont pas de lésions hépatiques. Deux ont quelques rares tubercules sur la rate dont le volume est resté normal. Les deux autres ont cet organe également indemne. Au contraire, chez les témoins, les rates hypertrophiées présentent de nombreux tubercules et deux d'entre eux ont quelques lésions hépatiques.

EXPÉRIENCE III. — 4 cobayes reçoivent dans le péritoine, le 24 février 1932, 10 milligrammes de BCG. Le 19 mars suivant, les 4 cobayes prémunis et 4 cobayes témoins reçoivent dans le péritoine 0 milligr. 00001 de la souche bovine Vallée.

Deux cobayes prémunis et 1 cobaye témoin sont sacrifiés le 14 avril 1932. Ce dernier a de gros nodules épiploïques et mésentériques et une rate hypertrophiée, alors que les 2 cobayes prémunis sont normaux.

Le 20 avril, les survivants (2 prémunis, 4 témoins) sont sacrifiés. Comme

dans les expériences précédentes, on observe une différence marquée entre les lésions péritonéales des premiers et celles des seconds qui sont plus importantes. Les cobayes prémunis ont une rate de volume normal; l'une est indemne, l'autre présente deux petits tubercules. Les rates des cobayes témoins sont hypertrophiées et sont parsemées de nombreux tubercules.

*Ainsi, dans les deux premières expériences où les cobayes ont été éprouvés par inoculation intrapéritonéale de 0 milligr. 0001 de la souche bovine Vallée, et dans la troisième expérience où*



FIG. 3. — Cobayes de l'expérience III prémunis par injection intrapéritonéale de 10 milligrammes de BCG et éprouvés par inoculation intrapéritonéale de 0 milligr. 00001 de la souche bovine Vallée. A, rates des cobayes prémunis; B, rates des cobayes témoins.

*ils n'ont reçu que 0 milligr. 00001 de ces bacilles virulents, les cobayes prémunis par injection préalable de 10 milligr. de BCG dans le péritoine se sont montrés plus résistants à cette infection sévère que les témoins.*

### Conclusions.

Les expériences que nous avons effectuées avec Boquet, comme celles dont nous rapportons les résultats dans ce tra-

vail, démontrent la fixité des caractères d'atténuation du bacille BCG.

Chez les cobayes inoculés sous la peau avec une forte dose de BCG (10 milligr.) et traités par des injections sous-cutanées de substances ciro-graisseuses du bacille de Koch ou de matières grasses telles que l'huile d'olive, qui favorisent la multiplication des bacilles tuberculeux *in vivo* et activent l'évolution de la tuberculose expérimentale des animaux de laboratoire, le BCG se montre incapable de reprendre sa virulence originelle.

Les injections d'extrait acétonique de bacilles de Koch à des cobayes préalablement inoculés avec des filtrats sur bougie Chamberland L<sub>2</sub> de cultures de BCG nous ont permis de démontrer que les cultures de ce germe contiennent des éléments filtrables. Les bacilles acido-résistants, issus de ces derniers, n'ont pas repris de virulence chez le cobaye sous l'influence des injections de substances ciro-graisseuses du bacille de Koch, qui rendent virulents les éléments filtrables dérivés des bacilles tuberculeux virulents.

Chez les cobayes infectés avec un bacille tuberculeux virulent, soit par voie intestinale, soit par voie oculaire, et rendus allergiques, l'ingestion de 4 centigrammes de BCG, un mois après l'infection, n'a provoqué aucune aggravation des lésions.

Il est facile de mettre rapidement en évidence la résistance conférée au cobaye par une injection préalable de BCG en le prémunissant par la voie péritonéale avec 10 milligrammes de ce microbe, puis en l'éprouvant par inoculation de 0 milligr. 0001 ou 0 milligr. 00001 de bacilles virulents par la même voie. Si l'on sacrifie ces animaux trois semaines après l'inoculation d'épreuve, on constate une différence manifeste entre les lésions des animaux prémunis et celles des animaux témoins.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] A. BOQUET et L. NÈGRE, Sur la fixité des caractères d'atténuation de la virulence du BCG, *C. R. Soc. Biol.*, **103**, p. 290.
- [2] A. BOQUET et L. NÈGRE, Action des divers constituants du bacille de Koch sur l'évolution de la tuberculose expérimentale du lapin et du cobaye. *C. R. Acad. des Sciences*, 3 mars 1924.

- [3] L. NÈGRE, Action de l'huile d'olive et de l'huile de foie de morue sur la tuberculose expérimentale du cobaye et du lapin. *C. R. Soc. Biol.*, **109**, p. 1107.
- [4] L. NÈGRE et J. VALTIS, Action des extraits acétoniques de bacilles de Koch sur les propriétés pathogènes des éléments filtrables du virus tuberculeux. *Ces Annales*, **46**, p. 587.
- [5] T. DE SANCTIS MONALDI, Les éléments filtrables du BCG, *C. R. Soc. Biol.*, **107**, p. 804.
- [6] A. CALMETTE, A. BOQUET et L. NÈGRE, Contribution à l'étude du bacille tuberculeux bilié. *Ces Annales*, **35**, p. 561 ; Essais de vaccination du lapin et du cobaye contre l'infection tuberculeuse. *Ces Annales*, **36**, p. 625.
- [7] C. NINNI, Essai d'immunisation locale intradermique du cobaye par le BCG. *Giorn. di Batt. E. Immunol.*, avril 1930, p. 471.
- [8] J. VALTIS et F. VAN DEINSE, Sur l'immunisation locale du lapin par injections intradermiques en couronne du bacille de Calmette-Guérin. *C. R. Soc. Biol.*, **109**, p. 1112.

**LA « MICROCULTURE » DU VIRUS TUBERCULEUX  
ET SON IMPORTANCE POUR LE DIAGNOSTIC PRÉCOCE  
DE LA TUBERCULOSE RÉNALE  
PAR L'ENSEMENCEMENT DES URINES.**

par A. SAENZ et D. EISENDRATH.

*(Institut Pasteur. Laboratoire de la Tuberculose.)*

Au cours de nos recherches sur la sensibilité respective des méthodes de culture directe des bacilles tuberculeux, l'un de nous (1) a eu l'occasion d'insister à plusieurs reprises sur la grande utilité du raclage des tubesensemencés avec des produits suspects avant l'apparition de toute colonie macroscopiquement visible, comme moyen pratique d'établir un diagnostic précoce. Dans cette note, nous désirons exposer les résultats de l'étude bactériologique de 57 cas suspects de tuberculose rénale du service du professeur Legueu, à l'hôpital Necker.

Notre technique consiste à centrifuger 20 à 50 cent. cubes d'urine (souvent trouble ou sanguinolente) et à déposer dans un mortier stérile le culot que nous broyons avec du sable également stérile. Nous traitons ensuite ce culot par un volume égal, soit d'acide sulfurique (selon le procédé de Löwenstein-Sumijoshi-Hohn) à 10 ou 12 p. 100 pendant quinze à trente minutes, quand l'infection paraît intense ; soit, lorsque la flore microbienne est peu abondante, par la soude à 4 ou 10 p. 100, avec un contact variant de trente minutes à quatre heures, à la température du laboratoire. Nous neutralisons ensuite (en présence ou non d'un indicateur [tournesol] avant d'ensemencer) avec une solution de soude ou d'acide à 20 ou 30 p. 100,

(1) J. VALTIS et A. SAENZ. *C. R. de la Soc. de Biol.*, **103**, 1930, p. 134 ; A. SAENZ, *C. R. de la Soc. de Biol.*, **107**, 1931, p. 26 et 1455 ; A. SAENZ et MANSEAU. *C. R. de la Soc. de Biol.*, **109**, 1932, p. 1115 ; A. SAENZ et L. COSTIL. *C. R. de la Soc. de Biol.*, **110**, 1932, p. 1189.

jusqu'à obtention d'un pH égal à 7.2. Nous ensemençons la totalité de notre culot ainsi préparé à la surface de 6 ou 8 tubes du milieu de Löwenstein au vert malachite, ou sur celui de

TABLEAU I. — Examen direct et culture positifs.

NUMÉROS DES CAS	MICROCULTURES	MACROCULTURES	DIAGNOSTIC
1	16	27	Néphrectomie le 13 novembre 1931 pour tuberculose rénale confirmée par la pièce.
2	17	35	Tuberculose rénale bilatérale.
8	12	19	Néphrectomie pour tuberculose rénale. Pièce partie supérieure du rein presque exclue. Diagnostic : tuberculose ulcéro-caséeuse.
6	10	17	Néphrectomie pour tuberculose rénale, juillet 1931; urines restent troubles.
7	11	18	Diagnostic : tuberculose rénale. Pas opéré encore (août 1932).
12	10	18	Néphrectomie pour tuberculose rénale (28 janvier 1932). Confirmée par pièce.
13	9	18	Néphrectomie pour tuberculose rénale (1 <sup>er</sup> février 1932). Confirmée par pièce.
14	16	22	Néphrectomie pour tuberculose rénale. Confirmée par pièce.
15	12	21	Diagnostic : tuberculose rénale. Pas opéré encore (août 1932).
16	9	15	Opéré en mai 1931 pour épидидymite tuberculeuse. Suspect de tuberculose rénale mais pas encore opéré (août 1932).
25	10	17	Enfant avec incontinence. Suspect de tuberculose rénale. Néphrectomie le 13 mai 1932.
26	18	25	Enfant colibacillose. Suspect de tuberculose rénale.
29	9	19	Suspect de tuberculose rénale.
30	9	19	Néphrectomie pour tuberculose rénale en 1927. Persistance d'une cystite.
31	9	19	Néphrectomie pour tuberculose rénale confirmée par pièce (18 mai 1932).
32	8	20	Néphrectomie en 1930 pour tuberculose rénale. Urine reste trouble.
39	8	16	Suspect de tuberculose rénale.
40	8	16	Diagnostic : tuberculose rénale, par M. Chabanier.
46	8	15	Tuberculose rénale bilatérale.
55	8	13	Epидидymite tuberculeuse. Vésiculite séminale tuberculeuse. Suspect de tuberculose rénale. Ostéite, côte tuberculeuse.

Petragnani dans lequel est substituée l'asparagine à la peptone. De très nombreux essais nous ont démontré que ces deux milieux étaient de beaucoup les plus favorables à l'isolement des bacilles tuberculeux, très supérieurs dans tous les cas aux

milieux de Petroff, Dorset, Lubenau et Hohn. Les recherches expérimentales que nous poursuivons avec L. Costil sur des souches de bacilles tuberculeux humains et bovins ont d'ailleurs démontré ce que nous venons de dire, et ont été confirmées après nous par C. Ninni (1) et par nos autres collègues du laboratoire du professeur Calmette à l'Institut Pasteur (2).

TABEAU II. — Examen direct négatif. Culture positive.

NUMÉROS DES CAS	MICROCULTURES	MACROCULTURES	DIAGNOSTIC
3	0	27	Néphrectomie pour tuberculose rénale en 1929. Fréquence persistante.
5	12	18	Diagnostic : tuberculose rénale. Non opéré.
22	10	18	Néphrectomie pour tuberculose rénale confirmée par pièce. Diagnostic : tuberculose ulcéro-caséeuse localisée (1932).
23	3)	60	Néphrectomie en 1928. Hémoptysie en 1932 (tuberculose pulmonaire avancée). Mort. Pas d'autopsie.
34	8	36	La pièce anatomique a montré une hydro-néphrose tuberculeuse.
33	18	36	Néphrectomie en juillet 1931. Urine reste trouble.
45	16	23	Néphrectomie pour tuberculose rénale en 1926. Fréquence persistante.
53	20	29	Néphrectomie pour tuberculose rénale le 9 août 1932. Pièce non gardée.
54	8	0	Néphrectomie pour tuberculose rénale le 28 juillet 1932.
60	18	26	Suspect de tuberculose rénale.

Sur les 57 échantillons d'urines que nous avons étudiés, 30 ont donné un résultat positif et 27 un résultat négatif. Sur les 30 cas qui ont donné un résultat positif, 20 ont présenté des bacilles à l'examen direct et 10 n'en présentaient pas.

Ces résultats sont consignés dans les tableaux I, II et III.

(1) C. NINNI, *C. R. de la Soc. de Biol.*, 107, 1931, p. 984.

(2) Voici comment on procède : on fait dissoudre 1 gr. 25 d'asparagine dans un vase d'Erlenmeyer de 1 litre, où l'on a préalablement versé 200 grammes de lait frais de vache et 8 grammes de farine de pommes de terre (marque Vosges). On chauffe au bain-marie jusqu'à l'ébullition pendant une heure et, pour le reste, on suit exactement la technique indiquée par Petragani. Sul terreno al verde di malachite et sulla tecnica par l'isolamento dei Bacilli tubercolari. *Policlínico (Sez. pratica)*, 1928.

TABLEAU III. — Examen direct négatif. Culture négative.  
Cobayes négatifs.

NUMÉRO DES CAS	CULTURE	COBAYE	DIAGNOSTIC
4	—		Néphrectomie pour tuberculose rénale en septembre 1930. Traité par rayons ultra-violet.
9	—	—	Culture pratiquée en janvier 1932.
10	—	—	Hémiplégie. Urine très trouble.
11	—		Néphrectomie pour tuberculose rénale confirmée par pièce (26 novembre 1932). Culture pratiquée le 26 mars 1932.
17	—	—	Colibacillose; suspecte de tuberculose.
18	—	—	Colibacillose; suspecte de tuberculose.
19	—		Néphrectomie pour tuberculose rénale le 15 février 1932. Pièce : aucune trace de lésion rénale. Culture pratiquée le 5 février 1932.
20	—	—	Néphrectomie pour tuberculose rénale. Pièce : Deux tiers supérieurs du rein presque totalement transformés en cavités caséo-purulentes. Culture pratiquée après néphrectomie.
21	—	—	Diagnostic : tuberculose rénale droite. Pas encore opéré (août 1932).
24	—	—	Suspect tuberculose rénale. Pas encore opéré (août 1932).
35	—		Néphrectomie pour tuberculose rénale le 18 avril 1932 confirmée par pièce. Culture pratiquée après néphrectomie.
36	—		Colibacillose. Suspecte de tuberculose rénale.
37	—		Colibacillose. Suspecte de tuberculose rénale.
38	—		Enfant avec néphrite chronique.
41	—		Hématurie. Néphrite subaiguë.
42	—	—	Enfant avec pyurie et calcul vésical.
43	—		Néphrectomie le 11 mai 1932 pour tuberculose rénale. Pièce montre forme inhabituelle. Pas de bacille de Koch par coloration des tissus. Culture pratiquée le 29 avril 1932.
47	—		Néphrectomie pour tuberculose rénale le 18 juin 1932. Pièce pas trouvée. Culture pratiquée le 8 juin 1932.
48	—		Néphrite amyloïdique.
49	—		Pyurie. Suspect tuberculose.
50	—		Néphrose lipidique.
51	—		Tuberculose pulmonaire. Epididymite tuberculeuse. Vésiculite séminale tuberculeuse.
52	—		Colibacillose. Suspecte de tuberculose rénale.
56	—		Epididymite tuberculeuse.
57	—		Mal de Pott récent. Sinus suspect, tuberculose du rein droit.
58	—		Néphrectomie pour tuberculose rénale le 25 juin 1932. Plaie reste ouverte. Culture pratiquée le 12 août 1932.
59	—		Tuberculose pulmonaire. Ostéomyélite. Bras gauche tuberculeux (10 août 1932). Néphrectomie pour tuberculose rénale. Culture pratiquée le 12 août 1932.
	—		Hématurie rein gauche. Suspecte tuberculose rénale.

Les résultats concernant les 10 cas dans lesquels on n'a pas trouvé de bacilles à l'examen direct et qui ont donné par la suite une culture positive sont consignés dans le tableau n° II.

Les 27 cas qui ont donné un résultat négatif sont consignés dans le tableau n° III. Il faut noter que, parmi ces cas, 7 ont fait l'objet de recherches comparatives entre les résultats de la culture sur les milieux précédemment indiqués et l'inoculation au cobaye.

Dans nos 30 cas de cultures positives (sauf dans le cas n° 3 pour lequel le raclage n'a pas été fait) nous avons obtenu, par l'ensemencement, des microcolonies de bacilles acido-résistants par raclage de nos tubes dans les délais ci-après indiqués.

A. — Délais précédant l'apparition de la microcolonie (raclage) :

Jours . . . . .	8	9	10	11	12	16	17	18	20	30
Nombre de cas . . . . .	7	5	4	1	3	3	1	3	1	1

B. — Délais précédant l'apparition de la macrocolonie :

Jours . . . . .	15	16	17	18	19	20	21	22	23	25	26	27	29	35	36	60
Nombre de cas . . . . .	3	2	2	5	4	1	1	1	1	1	1	2	1	1	2	1

Il ressort très nettement de la lecture de ces deux tableaux que, dans les 30 cas où nous avons obtenu un résultat positif, notre procédé de recherche de la microculture nous a permis de poser un diagnostic avec un délai moitié moindre que le délai nécessaire à l'apparition des macrocultures. Il reste à interpréter le cas n° 54, qui n'a pas donné de macroculture par la suite et qui correspond à l'ultravirus de Calmette et Valtis.

De plus, il est intéressant de noter que, dans 5 cas où l'inoculation au cobaye a fourni un résultat positif concordant, l'examen du raclage des microcultures fut aussi positif huit jours avant que le cobaye inoculé ait réagi à l'intradermo-réaction à la tuberculine, ou qu'il ait présenté une adénite inguinale suspecte.

Nous faisons remarquer que, en ce qui concerne l'examen direct, nos résultats concordent tout à fait avec ceux obtenus à la clinique de l'hôpital Necker.

Parmi nos 57 cas étudiés, les cas 25 et 39 présentaient, dans les milieux de culture spéciaux, les caractères du bacille tuber-

culeux bovin. Mais l'étude de cette question, que nous poursuivons avec L. Costil, fera l'objet d'un travail ultérieur.

D'ores et déjà, nous pouvons dire que, dans nos expériences, nous n'avons jamais trouvé de bacilles aviaires, ni de bacilles paratuberculeux du smegma préputial.

Il ressort de ces recherches expérimentales, cliniques et anatomo-pathologiques, portant sur les 57 cas étudiés par nous, que, dans toutes les circonstances où l'on suppose que le virus tuberculeux peut être présent dans une urine, on ne peut plus se contenter du seul examen direct, insuffisant dans 25 p. 100 des cas pour pouvoir établir un diagnostic étiologique. Il est indispensable d'ensemencer le culot de 20 à 50 cent. cubes d'urine sur 6 à 8 tubes des milieux préparés selon la technique indiquée, et surtout de procéder à l'examen systématique du produit de raclage de chaque tube, à partir du huitième jour.

On peut ainsi, comme nous l'avons vu, poser un diagnostic précoce et précis dans bien des cas où l'examen direct du culot est négatif. Cette méthode est plus rapide et plus sûre que l'inoculation au cobaye. Elle offre l'avantage de permettre éventuellement l'isolement de bacilles acido-résistants (aviaires, paratuberculeux), non pathogènes pour cet animal, et aussi d'identifier immédiatement les types humains ou bovins qui se présentent. La simplicité, la facilité de l'emploi de cette méthode et la précision des résultats qu'elle fournit font qu'elle s'impose désormais pour le diagnostic des tuberculoses rénales.

## **BACILLÉMIE TUBERCULEUSE AU COURS D'INFECTIONS AIGÜES NON TUBERCULEUSES**

par JEAN TROISIER et T. de SANCTIS MONALDI

avec la collaboration  
de R. CATTAN et de M<sup>me</sup> KOURILSKY.

L'étude de la bacillémie tuberculeuse présente à l'heure actuelle un renouveau d'intérêt. Pendant longtemps les auteurs, ne disposant pas d'une technique d'hémoculture satisfaisante, se contentèrent de pratiquer des inoculations de sang au cobaye. Les résultats, il faut bien le dire, ne furent pas très concluants et les séries positives obtenues par quelques auteurs, au regard des échecs subis par nombre d'expérimentateurs moins heureux, donnaient l'impression d'avoir été des séries d'exception.

Depuis les recherches de E. Læwenstein (de Vienne), la question a pris une toute autre tournure. Cet auteur a préconisé une technique d'hémoculture qui donne des résultats très supérieurs, quoiqu'elle soit assez difficile à mettre en œuvre. Elle est basée avant tout sur la récolte du sang en milieu citraté, sur le laquage acide de ce sang et sur l'ensemencement du culot sur un milieu à base d'œuf, d'asparagine, de sels minéraux, de vert malachite ou de rouge congo.

Grâce à cette technique, Læwenstein et ses collaborateurs ont pu déceler le bacille de Koch dans le sang des tuberculeux, pulmonaires et autres, avec une fréquence que jamais aucun auteur n'avait pu obtenir. Si, dans la tuberculose au début, l'hémoculture n'est guère souvent positive (10 p. 100), par contre, dans la phthisie confirmée, on peut trouver jusqu'à 70 p. 100 de résultats positifs.

Læwenstein ne s'est pas contenté de rechercher le bacille de Koch chez les sujets tuberculeux; il a étendu ses travaux à de nombreuses maladies qui n'avaient pas encore fait leurs preuves étiologiques et il a pu ainsi, pour certaines d'entre elles — le rhumatisme articulaire aigu et la sclérose en plaques, par exemple — trouver, dans de multiples cas, une bacillémie

positive (1). De là à conclure que ces maladies étaient d'essence tuberculeuse, il n'y avait qu'un pas à franchir.

Nous nous sommes demandé si l'interprétation de ces faits incontestables était bien exacte et s'il n'y avait pas lieu de penser que le bacille de Koch pouvait se trouver parfois dans le sang de certains malades, sans qu'il soit en réalité l'agent pathogène de ces maladies d'étiologie inconnue.

Pour élucider cette question, nous avons systématiquement mis en culture le sang de sujets atteints de maladies aiguës évidemment non tuberculeuses. L'étiologie de ces maladies était dûment affirmée pour chaque sujet par l'isolement et la caractérisation de leurs microbes pathogènes : pneumocoques, streptocoques, méningocoques, bacille d'Eberth, etc. Cette étude avait déjà été faite par Lœwenstein, au moins pour quelques maladies, et n'avait abouti qu'à des résultats négatifs (2).

Pour augmenter nos chances de succès, nous avons employé la technique suivante, dérivée des travaux de Lœwenstein et de Petraghani [de Sienne] (3). Dans le milieu préconisé par ce dernier auteur, nous avons remplacé la peptone par l'asparagine dont on connaît l'action très favorable au développement du bacille tuberculeux.

TECHNIQUE. — 10 cent. cubes de sang veineux sont recueillis dans 2 cent cubes de citrate de sodium à 10 p. 1.000.

Après lente décantation ou centrifugation, le plasma est aspiré avec une pipette à boule et rejeté, en ayant soin de respecter la couche leucocytaire.

On ajoute en deux à trois fois 50 à 60 cent. cubes d'une solution aqueuse

(1) REITTER et LÖWENSTEIN, Akute Gelenkrheumatismus und Tuberkelbациllämie. *M. M. W.*, n° 36, 1930, p. 1522.

LÖWENSTEIN, Ueber symptomloses Vorkommen von Tuberkelbazillen im Tonsillengewebe bei rezidivierendem Gelenkrheumatismus und bei Neuritis retrobulbaris. *M. M. W.*, 48, n° 26, 26 juin 1931.

LÖWENSTEIN, Tuberkulose als Ursache der Erkrankungen des Zentralnervensystems. *Psych.-Neurol. Woch.*, n° 32, 1931.

LÖWENSTEIN, Das Vorkommen der Tuberkelbazillämie bei verschiedenen Krankheiten. *M. M. W.*, n° 7, 13 février 1931, p. 261-263.

E. LÖWENSTEIN, Die Methodik der Reinkultur von Tuberkelbazillen aus dem Blute. *D. M. W.*, n° 24, 1930.

(2) Konrad cependant aurait obtenu deux résultats positifs dans la leucémie lymphatique et le mycosis fongoïde. Popper signale, dans cinq cas de septicémie, des bacilles acido-alcoolo-résistants à la surface des milieux de culture mais ne donne ni l'identification ni l'épreuve de la virulence pour ces bacilles.

(3) G. PETRAGHANI, Sul terreno al verde di malachite. *Il Policlinico. Sez. Pratica*, n° 27, 1928, p. 1295; et *Bollet. Istil. Sieroterap.*, fasc. 3, 1928.

d'acide acétique à 2 p. 100. L'ensemble des liquides, bien hémolysés, est centrifugé dans un gros tube, dix minutes à 6-7.000 tours.

On rejette le liquide surnageant et on ajoute 100 à 120 cent. cubes d'eau distillée stérile au culot que l'on a le soin de dissocier finement avec un agitateur stérile pour dissoudre ce qui reste d'hémoglobine. Nouvelle centrifugation et nouveau délayage du culot à l'eau distillée, si nécessaire, pour diminuer ainsi son acidité.

Le culot de centrifugation est alors ensemencé à la pipette, directement sur six tubes du milieu suivant :

Lait. . . . .	450 grammes.
Fécule de pomme de terre du commerce . . . . .	18 grammes.
Asparagine. . . . .	3 gr. 75

On fait bouillir dix à quinze minutes au bain-marie dans un flacon d'Erlenmeyer jusqu'à ce que le mélange soit bien consistant. Dans le flacon, on a jeté quelques gros morceaux d'une pomme de terre lavée, épluchée et bien essuyée. Ils remplacent avantageusement les billes de verre et permettent une agitation méthodique. Puis on maintient le milieu une heure à 56°.

Après refroidissement, on ajoute aseptiquement le contenu de 12 œufs complets (plongés au préalable une heure dans l'alcool à 95°) et 3 jaunes d'œuf. On filtre sur gaze stérile et on ajoute 36 cent. cubes de glycérine pure neutre stérile et 30 cent. cubes d'une solution aqueuse de vert de mala-chite stérile à 2 p. 100.

On distribue en tubes et on coagule à 85° pendant une heure. Le surlendemain, on remet les tubes dans le coagulateur une seconde fois pendant une demi-heure, mais sans dépasser 70°-75°. Capuchonner.

Avec cette technique et en utilisant ce milieu de culture, nous avons pu obtenir trois fois des cultures de bacilles tuberculeux en partant du sang de trois malades : une septicémie streptococcique greffée sur une endocardite rhumatismale ancienne, une pneumonie franche aiguë curable sans séquelles, une méningite cérébro-spinale suppurée mortelle provoquée par le méningocoque A. Soixante-treize fois nos hémocultures sont restées négatives (1).

(1) Voici la statistique de nos cas *negatifs* :

	NOMBRE DE CAS
Pneumonie. . . . .	5
Broncho-pneumonie . . . . .	4
Spléno-pneumonie . . . . .	1
Fièvre typhoïde Eberth. . . . .	6
Fièvre typhoïde Para A . . . . .	1
Fièvre typhoïde Para B . . . . .	2
Diphthérie. . . . .	3
Rougeole. . . . .	6
Scarlatine . . . . .	3
Erysipèle . . . . .	2
Furonculose, anthrax. . . . .	3

Voici tout d'abord les observations cliniques de ces trois sujets :

OBSERVATION I. — *Gran... (Léone)*, âgée de dix-sept ans, vendeuse, entrée à l'hôpital Bichat le 10 juin 1931 pour une crise de rhumatisme articulaire aigu.

Dans les *antécédents* de cette malade on trouve une première crise de rhumatisme articulaire en 1928 à l'âge de treize ans et demi. Elle fut soignée à l'hôpital Trousseau dans le service du Dr Lesné. Là on lui trouva un souffle systolique d'insuffisance mitrale. Elle fut traitée par 4 grammes de salicylate de soude *per os* et 2 grammes intraveineux. Les arthralgies cédèrent rapidement, mais à la convalescence survinrent les oreillons, si bien que la petite malade séjourna un mois et demi à l'hôpital. On avait noté à cette époque une cuti réaction à la tuberculose positive.

Depuis lors (1928), la malade n'a présenté qu'un peu d'essoufflement et quelques sensations subjectives au niveau de la région précordiale.

Le 4 juin 1931, début de la crise articulaire actuelle. Apparition brusque d'arthralgies dans le membre inférieur droit (hanche, genou, cheville). En même temps, angine rouge.

A l'examen, le 10 juin 1931, on constate que les articulations du membre inférieur droit sont tuméfiées, rouges et douloureuses à la palpation.

Au cœur, on retrouve le souffle systolique signalé par la malade. En jet de vapeur, situé à la pointe, il se propage vers l'aisselle et apparaît comme incontestablement lié à une insuffisance mitrale organique. Il existe de la tachycardie. La tension artérielle est de 11 1/2-8 au Vaquez.

Par ailleurs, l'examen ne montrait rien d'anormal.

*Evolution de la maladie* : On institue immédiatement un traitement salicylé intensif, 8 grammes *per os* ; 1 gramme intraveineux, qui fit rapidement disparaître les douleurs articulaires mais qui n'influença pas la fièvre, laquelle dès le début s'était maintenue aux environs de 38°.

Le 26 juin et le 6 juillet apparaissent de nouvelles localisations douloureuses à l'épaule gauche. Le 24 juillet, localisation vertébrale lombaire horriblement douloureuse.

Cependant, la température oscillant toujours aux environs de 38°, on pense à une endocardite secondaire greffée. Après une première hémoculture en bouillon négative, le 30 juillet, un deuxième examen, le 4 août, déce la présence d'un streptocoque typique dans le sang (longues chaînettes enchevêtrées, culture granuleuse en bouillon s'éclaircissant par le repos, pas d'hémolysine nette).

D'ailleurs, le tableau se complète par la constatation de petits signes de

Syphilis (dont 3 secondaires) . . . . .	6
Angines aiguës. . . . .	6
Gonococcie (2 arthrites, 4 pelvi-péritonites). . . . .	6
Paludisme . . . . .	3
Pyélonéphrite à colibacille . . . . .	2
Spirochétose ictéro-hémorragique. . . . .	1
Septicémies . . . . .	5
Dysenterie amibienne . . . . .	1
Sinusite, phlegmon, cholestyite aiguë. . . . .	3
Rhumatisme articulaire aigu. . . . .	4
Total. . . . .	37

néphrite : il existe dans les urines des cylindres granuleux, quelques globules blancs.

Pourtant, le 31 juillet, l'examen du sang montre qu'il n'y a ni leucocytose ni polynucléose :

Globules rouges. . . . .	3.320.000
Globules blancs. . . . .	6.400
Polynucléaires neutrophiles. . . . .	54
Polynucléaires éosinophiles. . . . .	2
Grands mononucléaires. . . . .	20
Moyens. . . . .	16
Lymphocytes. . . . .	8

Le 1<sup>er</sup> septembre, la malade se plaint d'une céphalée intense avec vomissements incessants. Il n'y a ni raideur de la nuque, ni signe de Kernig. Pas de paralysie, mais signe de Babinski bilatéral. Même état les 2 et 3 septembre. Mort brutale le 4 septembre.

L'autopsie, pratiquée le 5 septembre 1931, permet de confirmer entièrement le diagnostic d'endocardite streptococcique.

Sur les valves de la mitrale insuffisante et sur les cordages tendineux avoisinants, on trouve des végétations multiples plus ou moins ulcérées. Par contre, les sigmoïdes sont normales et le cœur droit est indemne. (Poids du cœur : 500 grammes.)

La cause immédiate de la mort est révélée par un vaste foyer hémorragique occupant la majeure partie de l'hémisphère droit (l'hémisphère gauche et le cervelet sont indemnes).

Une cicatrice blanchâtre, triangulaire, affirme un infarctus pas très ancien de la rate (420 grammes).

Les reins (180 et 150 grammes), les surrénales, le foie (1.700 grammes), les poumons apparaissent normaux, sans signes d'infarctus récents streptococciques.

L'examen minutieux des poumons ne permet pas de trouver trace de tuberculose. Le reste de l'autopsie d'ailleurs reste muet sur l'évolution quelconque de tuberculose et l'on ne put même trouver de ganglion suspect à l'examen macroscopique.

En résumé, il s'agissait indiscutablement d'une maladie d'Osler greffée sur une lésion ancienne d'insuffisance mitrale. L'étiologie rhumatismale de celle-ci paraissait cliniquement indiscutable.

Cependant, par hémoculture citratée, on isole du sang de cette malade, le 15 juin, un bacille de Koch du type humain.

Une deuxième hémoculture, pratiquée suivant la même méthode le 6 juillet, fut négative.

D'autres examens furent pratiqués dans le but de mettre en évidence une tuberculose en évolution.

Recherche des anticorps tuberculeux (9 juillet) :

Antigène aqueux du BCG. . . . .	Fixe 40 unités d'alexine.
Antigène Besredka . . . . .	+++
Antigène méthylque . . . . .	0

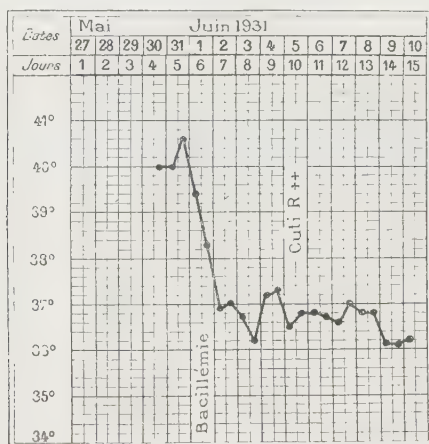
Cuti-réaction à la tuberculine (8 juillet) : très fortement positive.

- Réaction papuleuse de 1/2 centimètre . Le 9 juillet (24 heures).
- Réaction papuleuse de 15 millimètres . Le 11 juillet (3<sup>e</sup> jour).
- Apparition d'une vésicule. . . . . Le 12 juillet.
- Disparition . . . . . Le 20 juillet.

A noter que le père de cette malade était mort de *broncho-pneumonie caséuse*.

OBSERVATION II. — Mig... (François), âgé de vingt ans, entre à l'hôpital le 30 mai, pour point de côté, fièvre, atteinte de l'état général.

Début, le 27 mai, par un point de côté avec élévation de température, mais



Pneumonie franche aiguë. Bacillémie tuberculeuse le jour de la crise.

sans frisson et sans céphalée. Le 28, le malade essaya de se rendre à son travail, mais il fut obligé de rentrer immédiatement et de se coucher.

Le point de côté est, le jour de l'entrée, en voie de disparition, mais il existe de la toux, une dyspnée légère, une expectoration rouillée, collante au crachoir, caractéristique. La température est de 40°. L'examen direct des crachats et l'inoculation à la souris permettent de caractériser le *pneumocoque*.

A l'examen, on trouve une langue saburrale. Il n'y a pas d'herpès, ni de rougeur de la pommette. En avant, à droite, dans la fosse sous-claviculaire,

l'auscultation décèle un foyer de congestion avec souffle tubaire et râles sous-crépitaux.

Le 31 mai, la température s'élève à 40°. Le 1<sup>er</sup> juin, une crise s'annonce. La température est à 39°4 le matin; elle sera à 38°2 le soir. Le 2 juin, elle est revenue à la normale. Le malade est guéri. A noter que la crise urinaire ne s'amorce que le 3 juin.

Le malade est revu le 10 septembre. Il est parfaitement bien portant. L'épisode pneumonique qui a nécessité son séjour à l'hôpital n'a pas eu de lendemain. Un examen radioscopique montre l'intégrité parfaite des deux champs pulmonaires.

Somme toute, l'histoire est celle d'une *pneumonie typique*, avec début brusque, expectoration et signes physiques caractéristiques, guérison par crise thermique le septième jour, sans séquelles.

Cependant, nous avons pu mettre en évidence chez ce malade, le 1<sup>er</sup> juin, le jour même où s'amorçait la défervescence, l'existence d'une bacillémie tuberculeuse.

Une cuti-réaction à la tuberculine, pratiquée le 3 juin après la crise, se montra fortement positive : réaction papuleuse de 1 centimètre de diamètre.

OBSERVATION III. — *Mau... (Jean)*, vingt-quatre ans, entre, le 10 juillet 1931, à l'hôpital Bichat dans un état d'agitation délirante alternant avec des crises de somnolence presque comateuse.

On ne peut en tirer aucun renseignement, sinon qu'il serait malade depuis trois jours.

L'examen montre l'existence d'un syndrome méningé des plus nets : raideur de la nuque, signe de Kernig, raie méningitique. La respiration est irrégulière, entrecoupée de pauses. Les téguments des membres inférieurs sont couverts de pétéchies.

On découvre, en outre, une importante rhino-pharyngite avec angine rouge.

Incontinence d'urine; constipation absolue. Température irrégulière présentant de brusques clochers thermiques à 39° ou 40°.

La ponction lombaire permet de retirer un liquide séro-purulent où l'on trouve des polynucléaires très altérés et une quantité considérable de méningocoques intra et extracellulaires, sans aucun bacille acido-résistant. Le liquide contient, en outre, 1 gr. 50 d'albumine et seulement 0 gr. 48 de glucose.

Ce malade fut traité énergiquement par la sérothérapie intrarachidienne et intramusculaire. On utilisa d'abord le sérum polyvalent, puis, le germe ayant été identifié comme un méningocoque A, par Etienne Roux, au laboratoire de Dujarric de la Rivière, on injecta du sérum antiméningocoque A dans la cavité rachidienne. Le 25 juillet, apparition d'accidents sériques très importants (érythème, arthralgies). Ils coïncident avec une amélioration de l'état général du sujet. D'ailleurs, les méningocoques tendent à disparaître du liquide céphalo-rachidien. Le 29 juillet, on n'arrive plus à en mettre en évidence sur les étalements.

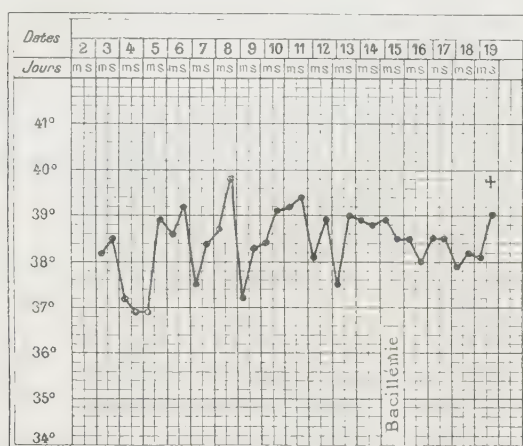
On institue cependant, devant la persistance de la fièvre et des raideurs, un traitement par injections intraveineuses de trypaflavine.

Le 3 août, une nouvelle ponction lombaire montre une quantité considérable de méningocoques, toujours sans bacilles acido-résistants.

On reprend très prudemment la sérothérapie le 4, d'abord par voie intramusculaire, en faisant précéder l'injection principale par deux petites injections de 0,5 et de 1 cent. cube. L'injection se passe normalement.

Le lendemain, devant l'aggravation de l'état général, on se croit autorisé à faire une injection intrarachidienne de 30 cent. cubes de sérum.

Le soir même, le malade succombe au cours d'une crise d'œdème aigu du



Méningite cérébro-spinale à méningocoque A. Bacillémie tuberculeuse.

poumon, malgré une saignée de 300 cent. cubes et une injection d'ouabaïne. L'autopsie n'a pas pu être pratiquée.

Chez ce malade, une hémoculture, le 31 juillet, met en évidence l'existence d'une bacillémie tuberculeuse que rien ne pouvait faire prévoir. On n'avait recherché, chez ce dernier malade, ni les réactions tuberculiniques, ni la présence d'anticorps tuberculeux dans le sang.

Il faut seulement noter que son frère serait mort antérieurement d'une méningite qualifiée de tuberculeuse.

Ainsi, la pratique de l'hémoculture a permis, en employant une technique appropriée avec des milieux de culture favo-

rables, de déceler le bacille de Koch dans le sang au cours d'une pneumonie franche aiguë, d'une endocardite maligne et d'une méningite cérébro-spinale.

Est-ce à dire que ces constatations permettent de penser que la pneumonie franche aiguë, que l'endocardite maligne, que la méningite purulente, étaient causées par le bacille de la tuberculose? Est-ce à dire que toutes les fois que l'on constate le bacille de Koch dans la circulation au cours d'une maladie aiguë déterminée, cette maladie, de ce fait, doit être considérée comme d'essence tuberculeuse? Tel est le problème que soulèvent les faits que nous apportons aujourd'hui.

Il est certes bien tentant, et souvent parfaitement légitime, d'affirmer qu'un germe isolé du sang d'un malade est le germe causal de sa maladie. Mais ne sait-on pas que, souvent, l'injection d'une culture microbienne à un animal de laboratoire fait apparaître une autre variété microbienne; que le premier microbe fait ainsi *sortir* de l'organisme un deuxième microbe, pathogène ou non?

Ne sait-on pas avec quelle fréquence les paratyphiques se multiplient dans l'organisme au cours d'infections variées? Après les avoir admis comme germes pathogènes spécifiques dans le hog-choléra, ne leur reconnaît-on pas un rôle secondaire dans la bactériologie actuelle? N'a-t-on pas signalé le bacille paratyphique B dans le paludisme (Job), dans la pneumonie franche [Lemierre (1), Loeper], dans la spirochétose ictéro-hémorragique [Widal et Weissenbach (2)]? Et dans ce dernier cas — remarquons la complexité du problème —, le paratyphique d'infection associée provoquait dans l'organisme des réactions d'agglutination spécifique!

Or, il n'est pas douteux que le paratyphique dans la pneumonie, dans la spirochétose ictérique, dans le paludisme ne joue aucun rôle dans le déterminisme du bloc pneumonique, de l'hépatonéphrite spirochétique ou de la splénomégalie palustre! Et cependant, ce germe, dans l'état actuel de la

(1) LEMIERRE et LEVESQUE, « Présence d'un bacille paratyphique B dans le sang d'un pneumonique sans fièvre paratyphoïde ». *Soc. méd. Hôp.*, Paris, 7 juillet 1922, p. 1045.

(2) F. WIDAL et R. I. WEISSENBACH, « Ictère spirochétosique à recrudescence fébrile. Bacillémie et bacillurie concomitantes à bacille paratyphique ». *Soc. m<sup>éd.</sup> Hôp.*, Paris, 12 mars 1926.

science, joue certainement un rôle pathogène évident dans le déterminisme d'une variété de fièvre typhoïde.

Les faits que nous apportons aujourd'hui doivent être interprétés, croyons-nous, dans le même esprit, en tenant rigoureusement compte des aptitudes de l'organisme humain à héberger le bacille de Koch.

Si, au cours d'une pneumonie franche aiguë, ou d'une poussée évolutive d'une maladie d'Osler, ou d'une méningite cérébro-spinale, nous avons pu déceler le bacille de Koch par hémoculture, c'est que les sujets étaient antérieurement atteints d'une tuberculose latente, occulte, torpide. A la faveur de la maladie aiguë pneumococcique, streptococcique, méningococcique, le bacille tuberculeux qui végétait dans l'organisme est *sorti* de ses repaires et a pu être caractérisé dans la circulation sanguine. Mais comme il s'agissait d'un microbe pour ainsi dire non pathogène pour le porteur, que seule une cutiréaction tuberculinique permettait de révéler, il ne s'est produit de processus tuberculeux aigu secondaire ni chez notre pneumonique, resté parfaitement guéri pendant sept mois, ni chez nos deux autres sujets qui ont succombé quelques semaines après leurs hémocultures. La jeune femme atteinte d'endocardite streptococcique greffée sur une vieille cardiopathie rhumatismale ne présentait à l'autopsie aucune lésion tuberculeuse visible à l'examen macroscopique le plus minutieux. Les bacilles qui avaient essaimé dans la circulation étaient sans doute partis d'un ganglion médiastinal sans lésion visible à l'œil nu (1). Notre méningitique, après une phase de franche amélioration sous l'influence de la sérothérapie anti-A, succombait à la repullulation massive des méningocoques A dans ses méninges sans qu'aucun bacille acido-résistant ait pu être décelé dans le liquide céphalo-rachidien.

Devons-nous rattacher à l'extrême malignité de ces deux derniers cas la bactériémie tuberculeuse positive? Nous en doutons, car, dans notre troisième cas, il s'agissait d'une pneumonie banale suivie d'une guérison parfaite et durable, con-

(1) C. REITTER et E. LOEWENSTEIN ont trouvé chez une rhumatisante morte des progrès de sa maladie (et qui avait antérieurement présenté deux hémocultures tuberculeuses positives) deux foyers ganglionnaires tuberculeux. *M. M. W.*, 78, n° 12, 20 mars 1931.

trôlée radiographiquement quatre mois après. Ne sait-on pas d'ailleurs, depuis Löwenstein, la fréquence de la bacillémie tuberculeuse dans des maladies non mortelles, comme la sclérose en plaques et le rhumatisme articulaire aigu? Le déclenchement de la bactériémie tuberculeuse par d'autres virus ne présente sans doute pas toujours par lui-même un caractère de gravité immédiate absolue.

Nous en arrivons donc à conclure que le bacille de Koch, chez nos trois malades, s'est comporté comme un *virus de sortie avirulent*; ce n'est pas lui qui était l'agent pathogène de la maladie qui a provoqué ou non la mort; c'est le streptocoque, c'est le pneumocoque, c'est le méningocoque qui étaient réellement les agents pathogènes; ce sont eux qui ont provoqué l'un l'endocardite maligne, l'autre le bloc pneumonique, le dernier enfin la pie-mérite généralisée. Le bacille de Koch a été révélé par l'hémoculture comme un agent pathogène accessoire. Ce n'est pas lui l'agent responsable de la maladie qui, par deux fois, a provoqué la mort.

\* \*

Autre caractère fondamental : les bacilles tuberculeux isolés du sang de nos malades étaient des *bacilles virulents du type humain*. On ne peut donc envisager l'erreur théoriquement possible d'un bacille tuberculeux aviaire qui aurait cultivé à partir d'un œuf provenant d'une poule tuberculeuse et incorporé dans le milieu de culture.

Voici les caractères des trois bacilles que nous avons isolés, qui nous permettent de les classer en toute sécurité :

I. SOUCHE GRA.... — Sur deux des six tubesensemencés le 14 juin 1931, nous observons, le 2 juillet, une colonie visible macroscopiquement. Chacune présente un diamètre de 2 millimètres environ, est sèche, rugueuse et très peu pigmentée. Les bacilles qui les constituent sont nettement alcoolo-acido-résistants. Ils sont longs et granuleux. La méthode de Gram met en évidence de nombreuses granulations gramophiles. Après trois semaines, les cultures de repiquage sont abondantes, restent peu pigmentées et prennent l'aspect normal des bacilles typiques des mammifères.

Les cobayes inoculés avec 0 gr. 0005 de culture par voie sous-cutanée meurent en quatre-vingt-quatorze à quatre-vingt-dix-huit jours avec toutes les lésions classiques de la tuberculose, type Villemin. Ceux, inoculés avec 0 gr. 00031, meurent après cent vingt-cent quarante jours; ceux, inoculés

avec 0 gr. 000001, meurent après cinq mois et demi à six mois avec des lésions caséeuses diffuses de tous les organes (rate pesant 6-8 grammes). Les lésions histologiques du cobaye sont les lésions classiques de la tuberculose type Villemin; en particulier, on trouve dans des tubercules sous-pleuraux les cellules géantes caractéristiques.

Cinq lapins restèrent indemnes, bien qu'inoculés avec 0 gr. 0001, 0 gr. 000001 et 0 gr. 000001 de culture. Sacrifiés après trois et quatre mois, ils ne présentaient aucune lésion. Un sixième lapin, inoculé avec 0 gr. 0001 de culture, est sacrifié en pleine santé après sept mois et demi. On lui trouve exclusivement au poulmon une dizaine de granulations grises qui se révèlent à l'examen histologique comme des tubercules typiques, avec cellules géantes, couronne lympho-plasmocytaire, et même pour l'un d'entre eux, nécrose centrale, pycnose nucléaire, aspect acidophile des protoplasmas et apparition de polynucléaires. Dans un tubercule, on trouve un bacille acido-résistant.

Toutes les poules inoculées (dans la veine avec 0 gr. 0001 et 0 gr. 00001) restèrent indemnes, même après cinq mois.

Cette souche, cultivée sur milieu de Sauton, a permis d'extraire une *tuberculine* qui s'est montrée sur l'homme identique dans ses effets à la tuberculine brute de l'Institut Pasteur. Les réactions cutanées ont été de même type et de même évolution.

II. SOUCHE MIG... — Des six tubesensemencés avec le sang de Mig..., dans l'un seulement, après dix-neuf jours, nous constatons la présence de nombreux bacilles acido-résistants, en faisant une préparation microscopique par raclage. Un examen attentif à la loupe nous fait supposer l'emplacement d'une colonie. Avec le fil, nous l'étaions sur place et, en effet, le 27 juillet 1931, c'est-à-dire après trente-deux jours, nous voyons deux belles colonies rugueuses, sèches, qui décolorent le milieu au pourtour et en profondeur. Repiqués sur de nouveaux milieux, on obtient des cultures très abondantes d'un bacille tuberculeux qui, par ses caractères cultureux, se rattache aux bacilles tuberculeux des mammifères. Sur milieux sans glycérine, les cultures ne se développent pas. Les bacilles sont, en général, longs, assez minces et très granuleux. Colorés au Gram, ils présentent de nombreux granules gramophiles. Avec la coloration de Ziehl, à côté de bacilles bien acido-alcool-résistants, on observe des bacilles et des granules qui ne gardent pas le Ziehl. Les cultures sur pomme de terre dégagent après un mois une forte odeur de tuberculine et se pigmentent légèrement.

Pour l'identification de la souche, nous avons pratiqué l'inoculation à des cobayes, à des lapins et à des poules. Les cobayes seuls, inoculés avec 0 gr. 0003 de la culture, ont présenté une tuberculose caséuse généralisée avec chancre d'inoculation après soixante-soixante-cinq jours. Les cobayes inoculés avec 0 gr. 0001 ont présenté, après un mois, des ganglions inguinaux gros comme des haricots et, sacrifiés à la fin du deuxième mois, des lésions discrètes de la rate et des rares tubercules des poulmons.

Les cobayes qui ont reçu 0 gr. 00001 et 0 gr. 000001 de la même souche ont tous fait des lésions locales. Les ganglions inguinaux étant en moyenne gros comme des pois vers la fin du deuxième mois.

Les lésions régressent ensuite lentement et, après six mois, ont complètement disparu. A l'autopsie on n'en trouve plus de vestiges nets et l'examen microscopique ne décèle pas de bacilles acido-résistants dans les ganglions.

Les lapins et les poules qui ont reçu par voie veineuse 0 gr. 0001 et

0 gr. 00001 de culture n'ont pas présenté le moindre trouble. Sacrifiés après des délais variés, entre deux et sept mois, ils n'ont montré aucune lésion tuberculeuse.

Avec cette souche (Migno.), nous avons obtenu une montée de virulence notable en inoculant 1 milligramme (0 gr. 001) de culture dans un ganglion cervical à un cobaye. L'animal mourut en *vingt jours* avec des lésions alvéolaires diffuses des poumons et des adénopathies caséuses au niveau des ganglions cervicaux et trachéobronchiques. Dans l'infiltrat alvéolaire se voient de nombreuses *cellules géantes* avec bacilles acido-résistants inclus.

Des caractères morphologiques de la culture qui se développe seulement en présence de glycérine, et des résultats des inoculations aux animaux de laboratoire, nous devons conclure qu'il s'agit d'un bacille tuberculeux de type humain, de virulence moyenne.

III. SOUCHE MAU... — Deux mois après l'ensemencement du sang, dans un seul tube, nous avons observé deux colonies de 1 à 2 millimètres de diamètre, sèches, rugueuses, dont les bacilles avaient les mêmes particularités que les précédentes quant à la forme et au nombre des granulations gram-positives et à la propriété alcool-acido-résistante. Les cultures obtenues par repiquage ne poussent que sur milieux glycinés et sont plus pigmentées sur pomme de terre que les deux premières.

Les poules et les lapins inoculés dans les mêmes conditions que ci-dessus restent indemnes. Les cobayes succombent avec une caséose massive du foie et de la rate après trente-quatre, soixante-quatre et quatre-vingt-dix jours pour des doses de 0 gr. 001, 0 gr. 0005 et 0 gr. 00001 de culture.

Ces différents caractères permettent donc d'affirmer qu'il ne s'agit pas de tuberculose aviaire — les poules restant indemnes — ni de tuberculose bovine — les lapins ne s'infectant pas —. La virulence des trois souches pour le cobaye dénote une origine humaine. Ces trois souches sont inégalement virulentes. Pour une même dose, par exemple 1/2 milligramme de culture en injection sous-cutanée, les cobayes meurent en soixante jours (souche Mig.), en soixante-quatre jours (souche Maug.) et en quatre-vingt-quatorze à quatre-vingt-dix-huit jours (souche Grandem.).

Les lésions anatomiques du cobaye sont les lésions classiques de la tuberculose du type Villemin, aussi bien macroscopiques (caséum) que microscopiques (cellules géantes multinucléées englobant des bacilles acido-résistants : souches I et II).

C'est dire que l'on peut accepter sans difficultés ni réserves que nos trois souches étaient bien des bacilles du type humain

Comment se fait-il dès lors, s'il s'agit de bacilles humains virulents, que nos trois malades n'aient pas présenté de signes cliniques ou anatomiques de tuberculisation ? Nous n'avons constaté chez eux que des signes de tuberculose occulte : cuti-réaction à la tuberculine fortement positive, et dans un cas anticorps tuberculeux positifs en se servant soit de l'antigène de Besredka, soit du BCG.

A l'autopsie de l'un d'entre eux, il fut impossible de trouver anatomiquement la preuve d'une pullulation quelconque du bacille de Koch : un autre, le pneumonique, guérit entièrement et un examen aux rayons X ne permit de rien déceler d'anormal quatre mois plus tard.

En réalité les bacillémies tuberculeuses que nous avons pu, par hasard, saisir au passage, devaient être des bactériémies paucibacillaires. Le petit nombre des colonies microbiennes trouvées pour chaque sujet, une ou deux colonies au maximum pour 10 cent. cubes de sang, est en faveur de cette thèse. On concevrait de la sorte qu'une bacillisation classique de l'organisme ne s'ensuive pas fatalement après une si pauvre bactériémie.

Néanmoins il y a lieu de penser que la bactériémie provoquée par une maladie aiguë est susceptible d'engendrer un processus aigu de bacillisation.

Le fait suivant que nous avons récemment observé, bien qu'il ne présente pas une valeur démonstrative absolue, est, à cet égard, éminemment suggestif :

Un garçon de seize ans, Clément J..., entre à l'hôpital le cinquième jour d'une pneumonie survenue brutalement en pleine santé. Il se plaint de douleurs poignantes à la base gauche, de dyspnée, de sensation d'étouffement de diarrhée, de vomissements. A l'auscultation, on trouve tous les signes d'un foyer pn-umonique de la base gauche. Une crise brusque termine la maladie le septième jour par la guérison.

Le facies du malade, un peu souffreteux, avait néanmoins attiré l'attention. Bien que l'examen des crachats, rouillés, eût décelé du pneumocoque et que l'inoculation à la souris eût provoqué la mort de celle-ci en quarante-huit heures avec septicémie pneumococcique, on recherche également les bacilles de Koch dans ses crachats : on en trouve quelques-uns après homogénéisation.

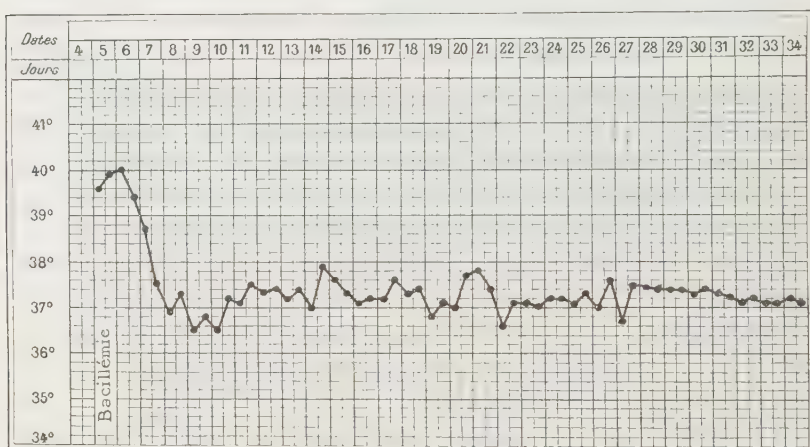
Simultanément on recueillait 10 cent. cubes de sang citraté pour la recherche de la bacillémie qui devait se montrer positive ultérieurement.

Les réactions bio-cliniques de tuberculose étaient toutes positives : une intradermo-réaction était positive au millième, le Vernes-résorcine s'élevait

à 35, la radiographie des poumons après guérison de la pneumonie décelait des infiltrats légers à la base gauche, et la température ne restait pas rigoureusement normale.

L'examen des cultures du sang, huit semaines après la pneumonie (le 14 janvier 1932), permettait de trouver deux bacilles acido-alcool-résistants typiques en raclant la surface des milieux, où aucune colonie n'était visible même à la loupe. Le repiquage de cette culture est resté stérile et nous pensons que le hasard seul nous a permis de déceler quelques unités bacillaires sans vitalité aucune.

Voilà donc un sujet chez lequel une bactériémie discrète a coïncidé avec une expectoration bacillifère provoquée par une



Pneumonie. Tuberculose latente.

pneumococcie aiguë! C'est la transition naturelle avec les trois faits que nous avons exposés au début de ce travail.

\*  
\* \*

Quelles conclusions tirer de ce qui précède? Tout d'abord il y a un fait certain, quoique difficile à démontrer et délicat à interpréter: c'est que *le bacille de Koch peut être mis en évidence dans le sang de l'homme au cours de maladies non tuberculeuses*. Cette constatation doit rendre l'observateur extrêmement circonspect lorsqu'il envisage l'étiologie d'un syndrome morbide quelconque, avant de conclure à sa nature tuberculeuse.

On peut admettre, d'autre part, qu'à la faveur d'une infection aiguë, le bacille de Koch, enclos jusque-là dans quelque lésion occulte peut en sortir et passer dans le sang sans provoquer la bacillisation de l'organisme.

L'avenir nous apprendra dans quelle proportion ces sujets à bacillémie positive au cours d'une maladie aiguë présentent ultérieurement une poussée évolutive tuberculeuse.

La pratique régulière et répétée de l'hémoculture, la confrontation des données bactériologiques avec l'observation suivie des malades, le relevé rigoureux des réactions spécifiques et leur évolution, tout devra être mis en œuvre pour apprécier dans quelle mesure le bacille tuberculeux observé dans le sang des malades peut être considéré comme un *virus de sortie* sans valeur pathogène *actuelle*, ou s'il est l'annonciateur d'un processus évolutif tuberculeux qui se prépare.

*Note additionnelle.*

Depuis la rédaction de ce mémoire, nous avons présenté à l'Académie de Médecine (séance du 3 mai 1932) une courte note résumant nos travaux. A la séance du 31 mai 1932, à la même Académie, le professeur Sergent a accepté notre interprétation dans sa communication sur la « Réactivation des foyers tuberculeux latents et les bacilles de Koch de sortie ».

## PROTECTION AGAINST TUBERCULOSIS WITH BCG VACCINE IN GUINEA-PIGS

by KONRAD E. BIRKHAUG.

*(From the Department of Bacteriology, University of Rochester  
School of Medicine and Dentistry, Rochester, New York.)*

That the movement has gained a new and significant impetus in recent years to increase man's resistance against tuberculosis infection by means of artificial tuberculinization is indisputable. The credit for this added interest is mainly due to the development of BCG. (*Bacillus Calmette-Guérin*) whose virulence is so low that even in large doses it is incapable of producing progressive tuberculosis when administered enterally or parenterally. Much evidence is already available that as a vaccine the BCG is capable of arousing an effective immunity response both in animals and man, either partly or wholly, to ward off an attack of virulent disease. Such were the claims originally made for the BCG by Professor Calmette and his colleagues at the Pasteur Institute. Not only in France and her colonies, but throughout the world, extensive experiments are in progress to appraise the full value of BCG as a prophylactic measure against tuberculous infection. It is undeniable that the majority of investigators uphold Calmette's original thesis of the harmlessness of BCG vaccination. On the other hand, a few opponents have voiced their belief that the BCG culture is not wholly avirulent, but that it is capable occasionally to produce progressive and fatal tuberculosis. One notes with interest that most workers claiming virulence for BCG resort to experimental artifices which deviate from Calmette's method of culturing the BCG. Such artifices include the cultivation of BCG on special media, in relative anaerobiosis, in pure culture or in combination with other virulent or avirulent organisms, and, again, in variant colonies dissociated from the original whole

culture, such as smooth " S " and rough " R " strains. And while the controversy continues to be waged between adherents and opponents of Calmette's contention of the harmlessness of BCG as a vaccine, over one million infants and numerous adults have been subjected to vaccination with this living organism. It is needless to stress the utmost importance of continued investigation of the fixity of this strain of tubercle bacillus until the proof of its reputed avirulence has been adequately presented by laboratory workers everywhere and by experiments conducted along entirely different lines. It is true that sharp criticism has been voiced in some quarters against the conservative attitude assumed by English and American investigators who maintain that the extensive use of BCG in human beings is unjustifiable on the ground that this culture is not a fixed virus and may mutate to become dangerous. A passionate analysis of this attitude has been given by Petroff who frankly anticipates a catastrophe to happen by the continued use of BCG. The soundness of this conservative stand is beyond question when human lives are concerned. But in spite of the Lübeck tragedy which needs must be ascribed to neglect in certain important precautions, as was reflected in the verdict rendered by the Superior Court at Lübeck, no cause for great alarm has been occasioned by the universal use of BCG in over one million persons.

Some justification exists for the use of a living organism such as BCG inasmuch as the employment of dead tubercle bacilli for the prevention of tuberculosis has never yielded results sufficient to make such vaccinations popular. Of late the belief is growing among medical experts that only the living attenuated tubercle bacilli can stimulate adequate resistance with which to ward off virulent infection. The popularity of BCG is directly attributable to this belief. But whether or not vaccination with BCG will continue to meet with universal approval must depend largely upon irrefutable proof that the vaccine is harmless.

The present study was undertaken three years ago because of existing conflicts in experimental data and difference of opinion that BCG is capable of arousing an effective immunity response against virulent disease. The questions I have

assayed to answer in the following experiments are these :  
Is the BCG culture avirulent and incapable of producing progressive tuberculosis in guinea pigs?

Is BCG capable of arousing an allergic response in newly-born or adult guinea-pigs vaccinated enterally or parenterally?

Is the degree and duration of cutaneous allergy related to resistance to superimposed virulent infection?

Do cultures of dissociated smooth " S " colonies of BCG produce progressive tuberculosis in guinea pigs as claimed by Petroff and his colleagues?

Finally, does the cultivation of BCG in deep broth cultures restore the original virulence of the culture as claimed by Dreyer and Vollum?

An enormous literature has accumulated, which answers most of these questions, since this study was undertaken. It is felt, however, that much more confirmatory evidence of the validity of claims made for BCG vaccination is highly desirable.

#### EXPERIMENTAL.

**TUBERCULINOGENIC PRINCIPLE OF BCG WHOLE AND DISSOCIATED CULTURES.** — Three strains of BCG were employed in these studies : BCG-Park No. 10, BCG-Rockefeller No. 9 and BCG-Pasteur No. 420-32, generously sent me by Drs. William H. Park, Florence R. Sabin and A. Calmette. No appreciable difference existed between these strains morphologically or culturally. Monthly transfers were made on Dorset's glycerine-egg, Calmette's glycerine-bile potato, glycerine potato and Sauton's synthetic medium. Extreme care has been taken to keep these cultures separate from virulent acid-fast organism. During the past year all BCG material was kept in a separate room accessible only to me and with the double precaution of placing a padlock on the incubator. Although Calmette has advocated the sole use of glycerine-bile potato, glycerine potato and Sauton's synthetic medium for the cultivation of BCG, I have carried the Park and Rockefeller strains on Dorset's glycerine-egg medium for 3 years without having observed any enhancement of virulence. Dissociation of BCG into " R " and " S " colonies was accomplished by allowing the emulsified

and paper filtered suspension to flow over the surface of 20 Petri plates containing Petroff's gentian-violet egg medium. These plates were sealed with rubber bands and incubated at 37°C from 3 to 8 weeks. Only a few "S" colonies were available and these were transferred to slants of Petroff's gentian-violet medium for further cultivation. The "R" colonies which predominated on all the plates were treated similarly. Eventually these cultures were floated on Sauton's synthetic medium and 5 per cent glycerinated broth for the production of tuber-

TABLE I. — **Tuberculin Reactions in Tuberculous Guinea-Pigs Tested Simultaneously with Tuberculins Produced by BCG Strains and Virulent Cultures (1).**

GUINEA-PIG Number	INTRACUTANEOUS INJECTION OF 0 C.C. 1 OF 5 PER CENT TUBERCULIN PRODUCED BY				
	Virulent strains of		Avirulent strains of		
	Human "H <sub>37</sub> "	Bovine "Vallee"	BCG-Park No. 10	BCG-Rockefeller No. 9	BCG-Pasteur No. 120-32
	Mm.	Mm.	Mm.	Mm.	Mm.
14 . . .	15 × 18	12 × 16	12 × 18	12 × 16	12 × 18
42 . . .	14 × 20	12 × 18	14 × 16	14 × 18	12 × 18
493 . . .	15 × 22	16 × 25	18 × 22	16 × 22	20 × 24
495 . . .	16 × 20	16 × 22	12 × 20	14 × 18	16 × 22

culin. Whole cultures of BCG and the virulent strains of "H<sub>37</sub>" and "Bovine Vallee" were also floated on Sauton's synthetic medium and 5 per cent glycerinated broth for the production of tuberculin. These cultures were grown for 6 weeks. At that time the entire culture was heated on the water bath at a temperature varying between 80 and 90°C until reduced to one-tenth the original volume. Final filtration took place through a Berkefeld N candle. A 5 per cent solution of tuberculin was always prepared in saline shortly before use and a standard dose of 0.1 cc. was always injected intracutaneously. The maximum diameters of redness observed 48 hours after injection of the tuberculin were recorded. Table I shows the tuberculin reactions in tuberculous guinea

(1) Maximum diameters of redness 48 hours after injection.

pigs tested simultaneously with tuberculins produced by the 3 BCG cultures and the virulent "H<sub>37</sub>" and "Bovine Vallee". It will be noted that no striking difference exists in the cutaneous reactions elicited with these various tuberculins. Table II also shows that little or no difference obtains in the cutaneous reactions elicited in tuberculous guinea pigs injected simultaneously with tuberculins produced by the whole BCG culture or its variant "R" and "S" colonies and that these reactions compare well with those obtained by tuberculins produced by virulent strains of tubercle bacilli. Inasmuch as it is generally

TABLE II. — **Tuberculin Reactions in Tuberculous Guinea Pigs Tested Simultaneously with Tuberculins Produced by (1) Rough "R", (2) Smooth "S" and (3) Whole BCG Cultures (1).**

GUINEA-PIG Number	INTRACUTANEOUS INJECTION OF 0 C.C. 1 OF 5 PER CENT TUBERCULIN PRODUCED BY BCG-PARK NO. 10		
	Rough "R" strain	Smooth "S" strain	Whole culture
	Mm.	Mm.	Mm.
446 . . . . .	14 × 14	14 × 16	14 × 14
441 . . . . .	9 × 9	10 × 10	12 × 12
449 . . . . .	15 × 15	15 × 15	17 × 19
435 . . . . .	15 × 15	15 × 15	14 × 24
448 . . . . .	10 × 12	10 × 10	12 × 14
446 . . . . .	15 × 15	15 × 15	13 × 15
430 . . . . .	10 × 10	8 × 10	11 × 12
445 . . . . .	14 × 14	11 × 12	11 × 14
42 . . . . .	12 × 12	12 × 14	12 × 14
431 . . . . .	10 × 10	10 × 10	10 × 12

believed that cutaneous allergy is a definite expression of immunity against virulent tuberculous infection, it is interesting to know that the BCG cultures employed universally for immunization against tuberculous disease contain the same tuberculinogenic principle as that possessed by cultures of virulent tubercle bacilli.

#### IMMUNITY EXPERIMENTS WITH BCG ON GUINEA PIGS.

I. RESISTANCE OF ORALLY BCG VACCINATED NEWLY-BORN GUINEA-PIGS TO VIRULENT TUBERCULOUS SUPERINFECTION. — Ten newly-born

(1) Maximum diameters of redness 48 hours after injection.

and tuberculin-negative guinea pigs, weighing on the average 80 grams, were fed 10 mgm (dry weight) of a 4 weeks culture of BCG-Park No. 10 from a pipette. During the first 4 days acid-fast organisms were recovered from the feces in abundance both in smears and in cultures prepared by Corper's method on gentian-violet potato. The passage of acid-fast organisms in the feces rapidly diminished until no organisms were found in 7 guinea pigs on the sixth day. A few organisms persisted in the feces in 1 guinea pig until the ninth day in the remaining 2 animals until the thirteenth and fifteenth days respectively. Diarrhea developed in 3 guinea-pigs on the day following the feeding of BCG, but cleared up promptly during the next 2 days. Intracutaneous tuberculin tests were performed at bi-weekly intervals with 0.1 cc. of a 5 per cent solution of bovine old tuberculin (Mulford) and the reading of the reaction was taken 48 hours after the intracutaneous injection. The first positive reaction occurred 15 weeks after the BCG feeding in 2 guinea-pigs; in 19 weeks 4 out of 10 guinea pigs gave positive tuberculin reactions. During an interim of 6 months following the oral administration of 10 mgm. of BCG no indications of tuberculous infection were noted in any of these animals and the average weight had increased from 80 to 342 grams.

Six months after the feeding of BCG approximately 100 virulent and living "H<sub>37</sub>" tubercle bacilli were injected subcutaneously in the right inguinal region in the 10 vaccinated and 10 control guinea-pigs of about the same weight and age as the vaccinated animals. No immediate allergic manifestations were observed in any one of the vaccinated guinea-pigs at the site of inoculation. The curves of average weight, tuberculin sensitivity and period of survival of the vaccinated and control groups of guinea pigs are shown in Chart I. It will be noted that 60 per cent of both groups became strongly tuberculin positive within 3 weeks following the virulent superinfection and that 2 weeks afterwards 100 per cent of both groups showed positive tuberculin reactions. The tuberculin test was repeated at monthly intervals and remained solidly positive until death of the animal took place.

No striking difference obtained between the vaccinated and control groups in the weight curves. The average period of

survival of the vaccinated group was 220 days as compared with 197 days for the control group. The difference of only 23 days in favor of the vaccinated guinea-pigs would seem negligible.

Autopsy material, both gross and microscopic, failed to reveal any marked difference, in degree and distribution of tuberculous lesions, between the vaccinated and control groups. It would appear, therefore, that the oral administration of BCG in newly-born guinea pigs fails to arouse sufficient immunity response to ward off fatal and progressive tuberculous disease.

These findings of irregular tuberculin sensitization and no increased resistance to superimposed virulent infection are readily explained by the experiments recently reported by Wethmar and Brunzema and Griffith who found that only a very small proportion of orally administered BCG organisms were capable to penetrate the mucous membrane of the alimentary tract and to pass to the neighbouring lymph glands to set up localised tuberculosis. The results reported, it would appear, do not support the contention of Calmette that the mucous membrane of the alimentary canal of the newly-born guinea-pigs is more permeable to the passage of BCG than that of older animals. Further study of parenteral administration of BCG, which will be discussed below, definitely indicates that the enteral mode of administering BCG yields the most uncertain results in increasing an animal's resistance to superimposed virulent tuberculous infection.

**II. RESISTANCE OF INTRAPERITONEALLY BCG VACCINATED GUINEA-PIGS TO VIRULENT TUBERCULOUS SUPERINFECTION.** — Ten normal and tuberculin-negative guinea-pigs, weighing on the average 380 grams, were injected intraperitoneally with a saline suspension containing 20 mgm. (dry weight) of a 4 weeks culture of BCG-Park No. 10. No immediate and unfavorable symptoms and signs developed following the inoculation. Intracutaneous tuberculin tests were performed at bi-weekly intervals with 0.1 cc. of a 5 per cent solution of bovine old tuberculin (Mulford) and the reading made 48 hours later. Within 2 weeks 30 per cent gave positive tuberculin tests, within 4 weeks 100 per cent. Cutaneous allergy began to decline at this time and 12 weeks after the intraperitoneal

BCG inoculation 60 per cent gave positive tuberculin tests, within 14 weeks 10 per cent and when tested within 16 to 18 weeks all the animals gave negative tests.

During the interim of 18 weeks following the BCG inoculation, the average weight of the vaccinated group had risen from 580 grams to 724 grams, a net gain of 140 grams. During this period no deaths had occurred as a result of the vaccination.

Development of abscesses and ulcers, either at the site of inoculation or in the scrotal sac occurred between 2 and 3 weeks after the intraperitoneal BCG inoculation in 4 guinea-pigs. The thick creamy caseo-purulent discharge contained numerous acid-fast organisms in smears and profuse growth of typical tubercle bacilli took place on Corper's gentian-violet potato when the material was streaked across its surface and the tubes incubated from 3 to 10 weeks at 37°C. Part of the caseo-purulent discharge was injected sub-cutaneously in 5 normal and adult guinea pigs. These were autopsied after 8 to 10 weeks without revealing tubercles any-where in the body except in the adjacent inguinal lymph glands where the purulent material was injected. As a rule, a localised swelling took place at the site of injection, in the course of 2 weeks after inoculation, which gradually softened, ulcerated and formed a discharging abscess. The adjacent lymph glands always participated in the swelling although the glands never ulcerated the skin nor became adherent to the same. The ulcers and abscesses usually healed promptly within 4 to 6 weeks and the only trace of the process was a white scar in the overlying skin.

Nineteen weeks after the intraperitoneal BCG inoculation approximately 200 living and virulent " $H_{37}$ " tubercle bacilli were injected subcutaneously in the right inguinal region in the 10 vaccinated guinea pigs. A group of 30 normal and tuberculin-negative guinea-pigs, of approximately the same age as the vaccinated animals, was likewise injected with about 200 living and virulent " $H_{37}$ " tubercle bacilli. These 30 animals will serve the purpose of control for the 3 groups of parenterally vaccinated guinea-pigs and the results reported will represent the average mean of body weight, tuberculin sensitivity and period of survival for the entire group.

Localized redness and swelling, at the site of the subcutaneous injection of the virulent tubercle bacilli, developed promptly in all the BCG vaccinated animals. It is interesting to note the occurrence of this typical allergic reaction in the absence of cutaneous allergy to old tuberculin. This allergic reaction persisted for 4 days. No similar reactions were observed in the control series. Development of an abscess at the site of the subcutaneous inoculation occurred in 3 vaccinated guinea pigs in the third week after the virulent superinfection. The creamy caseo-purulent discharge contained many acid-fast organisms in smears. The process healed rapidly and cicatrised completely, leaving only a white scar in the skin. The remaining 7 vaccinated guinea-pigs developed slightly enlarged inguinal glands in the neighbourhood of the virulent infection. The glands became stationary in size and failed in every instance to lead to ulceration through the overlying skin. No distressing symptoms or signs of progressive tuberculous disease developed in the BCG vaccinated group until 200 days after the virulent superinfection had taken place. During this interim the average weight of this group had risen to 900 grams, or a net gain of 176 grams since inoculation with virulent tubercle bacilli, while the control group showed a slightly lower gain in weight, namely 158 grams.

If the hypothesis is true that tuberculo-immunity is a function of tissue allergy by which the defense mechanism of the immune body is accelerated and exaggerated in the attempt to hem in the bacilli of superinfection and by this allergic reaction to interfere with the migration of the virulent organisms to other parts of the body, then new light will be shed upon this hypothesis by correlating the curves of cutaneous allergy obtainable in the BCG vaccinated guinea pigs and the control non-vaccinated animals. Thus it will be noted that 90 per cent of the intraperitoneally BCG vaccinated guinea-pigs became tuberculin-positive 3 weeks after the virulent superinfection and that the reactions rapidly declined to 40 per cent in 4 weeks, 20 per cent in 8 weeks and 10 per cent in 10 weeks. The tuberculin sensitivity remained at this low level for 24 weeks and gradually began to rise in direct proportion with development of symptoms and signs of a progressive

and fatal tuberculous infection. In contrast with this sudden rise and fall and gradual rise in tuberculin sensitivity, it will be noted that the control non-vaccinated animals became tuberculin sensitive simultaneously with the vaccinated animals, but that the curve of positive reactors remained solidly straight after having once become 100 per cent positive. It would thus appear that the allergic "barrier", so impressively demonstrated by Krause and Willis is readily stimulated into action by the BCG vaccination and that the visible ultimate consequence is the appearance of delayed, abortive or more chronic disease. This is clearly demonstrable in the curves of period of survival of the BCG vaccinated and the non-vaccinated animals. Here we find that the average period of survival of the vaccinated group was 304 days as contrasted with 189 days for the control group. The mean difference of 115 days in favor of the vaccinated animals is significant. The earliest death among the vaccinated group took place 177 days after the virulent superinfection, while the first control animal died 38 days after injection of the virulent tubercle bacilli.

Autopsy material, both gross and macroscopic, demonstrated that the vaccinating dose of 20 mgm. of BCG had produced a thickening of the omentum, with numerous bands and points of fibrous tissue interconnecting the omentum with the stomach, folds of intestine, the parietes and the viscera. Otherwise, no evidence was obtained, at this late date after the intraperitoneal injection of the BCG that the tuberculous lesions, which led to the death of the vaccinated group, differed in degree or distribution from those occurring in the control group. These findings are in accord with the extensive and thorough-going experiments of Krause and Willis who came to the conclusion that, in conducting immunity studies, the animals should be killed several months after the superimposed virulent infection, in order properly to appraise the immunity response of the vaccinated animals. Ordinarily, the immunity guinea pigs will never have died of tuberculosis as early as 3 to 4 months after the virulent superinfection, while the non-immunes develop visceral and fatal tuberculosis by this time.

III. RESISTANCE OF SUBCUTANEOUSLY BCG VACCINATED GUINEA-PIGS TO VIRULENT TUBERCULOUS SUPERINFECTION. — Ten normal and tuberculin-negative guinea pigs, weighing on the average 385 grams, were injected subcutaneously in the right inguinal area with a saline suspension containing 20 mgm. (dry weight) of a 4 weeks culture of BCG-Park No. 10. The area injected showed increasing tumefaction after 10 days and within 16 days the overlying skin became deeply red, swollen and firm. A softening process took place during the third week and this led to ulceration of the skin and abscess formation. A creamy caseo-purulent material discharged from the abscess. Numerous acid-fast organisms were seen in the smears of this material and the organism was recovered in culture on Corper's gentian-violet potato. Subsequent subcutaneous inoculation of this material into 3 normal guinea-pigs led to a repetition of the abscess formation, rapid healing and formation of scar tissue. When these animals were sacrificed 8 to 10 weeks later no trace of visceral tuberculosis was found and the regional lymph glands showed increased fibrous tissue formation surrounding central masses of caseous material. All the abscesses of the subcutaneously BCG vaccinated guinea-pigs healed and cicatrised completely within 2 to 3 months after the inoculation. Adjacent inguinal glands became slightly swollen along the tenth day after inoculation. In no instance was ulceration or abscess formation of the lymph glands noted. No symptoms or signs of tuberculous disease developed in any one animal during the first 17 weeks after the inoculation. The group had made an average net gain in weight of 325 grams during this period.

The bi-weekly tuberculin tests showed the following results: 10 per cent of the animals became tuberculin-positive 2 weeks after the subcutaneous BCG inoculation, 30 per cent in 4 weeks, 100 per cent between 6 and 14 weeks. At this time a decline in positive reactions was noted and only 50 per cent gave positive tests in 16 weeks and in 17 weeks the entire group gave negative reactions.

During the anergic phase, which occurred in the seventeenth week following the subcutaneous BCG vaccination, approximately 200 living and virulent "H<sub>37</sub>" tubercle bacilli were

injected subcutaneously in the left inguinal region in the 10 vaccinated guinea-pigs. The control group, tested similarly, has already been described elsewhere. The injected area became greatly swollen, red and soft within 24 hours. This allergic phenomenon persisted for 4 days when the process promptly subsided. Two weeks after the virulent superinfection, a marked local tumefaction occurred at the site inoculated 19 weeks previously with 20 mgm. of BCG. This delayed allergic reaction was observed in every one of the 10 vaccinated guinea-pigs. The swollen areas became soft and deeply injected. No ulceration took place to the surface and the inflammation process cleared up after 4 to 6 days.

Seven guinea-pigs developed an abscess at the site of the virulent superinfection 3 weeks after inoculation. Smears made of the creamy caseo-purulent discharge revealed numerous acid-fast organisms. These processes promptly healed and completely cicatrised until only delicate white scars indicated the previous site of the abscesses. For about 6 weeks following the injection of virulent tubercle bacilli, the regional lymph glands became slightly enlarged, but remained stationary in size and failed to ulcerate to the surface. No symptoms or signs of tuberculous disease were noticeable during 200 days after the virulent superinfection. During this interim, the average weight curve showed a gain of 190 grams. A gradual decline in the individual weight and general health became apparent about 32 weeks after the virulent superinfection.

Tuberculin reactions presented the identical sudden rise and subsequent delayed rise following the virulent superinfection as was already described in the animals injected intraperitoneally with BCG and later infected with virulent tubercle bacilli. Seventy per cent became positive with tuberculin 1 week after the virulent superinfection, 100 per cent within 4 weeks, with a drop to 30 per cent within 8 weeks and to 20 per cent from 9 to 20 weeks. A slow rise was observed to take place about 50 weeks after the virulent superinfection when 60 per cent of the guinea-pigs became tuberculin-positive and within 65 weeks all the surviving animals gave positive reactions. One notes with interest that the re-occurrence of positive tuberculin tests is concomitant with ominous

symptoms and signs of progressive tuberculous disease and exitus.

The average period of survival was 340 days for the subcutaneously BCG vaccinated animals as contrasted with 189 days for the non-vaccinated controls. The mean difference in longevity of 151 days, plus 1 surviving animal, are decidedly in favor of the subcutaneous mode of BCG vaccination. The earliest death among the vaccinated animals took place 151 days after the virulent superinfection, while the first control animal died 38 days after an identical virulent superinfection.

Autopsy material, both gross and microscopic, showed extensive tuberculous lesions throughout thoracic and abdominal organs, with heavy involvement of the lymph glands. Both in degree and distribution of tuberculous lesions it was difficult to detect any appreciable difference — at this late date after BCG vaccination — between the vaccinated and control groups.

The outstanding and significant feature of BCG tuberculo-immunity in guinea-pigs, of retarding the spread of virulent tubercle bacilli within the body, is strikingly exemplified in the following experiment. Guinea pig No 93, subcutaneously vaccinated with 20 mgm. of BCG, succumbed to visceral tuberculosis 443 days after the virulent superinfection with approximately 200 "H<sub>7</sub>" tubercle bacilli. At autopsy, a caseous mesenteric gland was excised, macerated and emulsified in saline. By direct count it was estimated that 0.1 cc. of this emulsion contained approximately 200 acid-fast organisms. This dose was injected subcutaneously in the right inguinal region. The guinea pig succumbed with extensive visceral and pulmonary tuberculosis 52 days after the inoculation. In short, the BCG vaccinated guinea pig was capable to resist approximately the same dose of virulent tubercle bacilli nearly 400 days longer than the non-vaccinated control animal.

IV. — RESISTANCE OF INTRADERMALLY BCG VACCINATED GUINEA-PIGS TO VIRULENT TUBERCULOUS SUPERINFECTION. — Ten normal and tuberculin-negative guinea pigs, weighing on the average 520 grams, were injected intradermally, in the skin overlying the right inguinal region, with a saline suspension containing 20 mgm. of a 4 weeks culture of BCG-Park No. 10. An intense

redness and marked tumefaction occurred 3 days later at the site of injection. The inflammatory process led to the production of a small abscess, about 5 to 8 mm. in diameter, about the fifth day. A thick caseo-purulent material discharged from the abscess. This material contained numerous acid-fast organisms which were recovered in culture on Corper's gentian-violet potato. Subsequent reinoculation into normal guinea pigs failed to produce progressive tuberculous disease. During the second week after the intradermal inoculation of BCG, the surrounding skin began to desquamate and hemorrhage was readily produced from the abscess by light pressure. Slight enlargement took place of adjacent lymph glands. These became stationary in size and at no time produced ulceration to the overlying skin. The abscess produced at the site of BCG inoculation continued to suppurate for 5 to 6 weeks at which time the wound healed and completely cicatrised. At this time the regional lymph glands were hardly palpable. During the interim of 16 weeks following the intradermal BCG inoculation no symptoms or signs of tuberculosis developed and the average gain in weight was 230 grams.

Bi-weekly tuberculin tests with 0.1 cc. of a 5 per cent solution of bovine old tuberculin (Mulford) showed the following reactions: 50 per cent of the animals reacted positively within 3 weeks after vaccination, 90 per cent within 5 weeks and 100 per cent from 6 to 16 weeks. Seventeen weeks after the BCG vaccination the cutaneous allergy dropped to 50 per cent and in 18 weeks to 20 per cent. It appears, therefore, that the more durable cutaneous allergy is produced by the subcutaneous and intracutaneous methods of administering the BCG vaccine.

During the anergic phase of cutaneous allergy in 80 per cent of the vaccinated animals, approximately 200 living and virulent " $H_{37}$ " tubercle bacilli were injected subcutaneously in the left inguinal region in all 10 animals. The control series of 30 guinea-pigs, similarly injected, has already been described under the intraperitoneally BCG vaccinated animals. Within 24 hours after the virulent superinfection, all the animals displayed the typical Koch phenomenon at the site of the injected tubercle bacilli. The deeply injected, soft and swollen area

gradually diminished during the following 5 days and no trace remained after 6 days. The regional lymph glands participated in the inflammatory reaction and became slightly enlarged. The peculiar delayed allergic reaction described above under the intraperitoneally and subcutaneously BCG inoculated guinea-pigs, was also observed in the intradermally BCG vaccinated animals. During the third week after the virulent superinfection, the area injected 20 weeks previously with BCG suddenly became inflamed and swollen. The reaction promptly subsided within 1 week without producing pigmentation or desquamation in the overlying skin.

Discharging abscesses developed in 4 guinea-pigs in the areas inoculated with the virulent " $H_{37}$ " tubercle bacilli. Numerous acid-fast organisms were found in smears made. These abscesses occurred during the third and fourth weeks after the virulent superinfection and persisted for 4 to 6 weeks when they healed completely. During the following 240 days after superinfection, the right inguinal glands remained hardly palpable in all but 5 guinea-pigs. During this interim no severe symptoms or signs of tuberculous disease were observed in the group of vaccinated guinea-pigs and the average weight had increased 150 grams.

The curve of tuberculin sensitivity presented the identical sudden rise and fall and subsequent delayed rise following the virulent superinfection in the intracutaneously BCG vaccinated animals as was described above under the intraperitoneally and subcutaneously BCG vaccinated animals. Within 2 weeks after the superimposed infection, 100 per cent gave positive tuberculin tests and in 9 weeks only 20 per cent gave positive reactions while 10 per cent reacted within 11 weeks. The gradual rise in positive reactions followed closely the concomitant increase in symptoms and signs of progressive tuberculous disease.

In the series of intradermally BCG vaccinated guinea pigs is encountered the most striking and suggestive tuberculo-immunity in retarding the fatal issue of virulent superinfection. It will be noted that the average period of survival of the vaccinated animals was 417 days following the virulent superinfection and 189 days for the non-vaccinated controls. This

represents the significant difference in longevity of 229 days, plus 1 surviving animal, in favor of the intradermal mode of BCG vaccination.

Autopsy material was studied carefully both macroscopically and in sections. No appreciable difference was detected at this late date after the BCG vaccination between this group and the control material.

#### VIRULENCE TESTS WITH BCG IN GUINEA-PIGS.

I. INTRAPERITONEAL INJECTION INTO GUINEA-PIGS OF DISSOCIATED SMOOTH " S " COLONY STRAIN OF BCG CULTURE. — After some initial difficulty, Petroff, Branch and Steenken were able to dissociate 2 distinct types of colonies of the BCG culture. The " R " or rough colony was found to grow rapidly on Calmette's glycerine-bile potato medium and in small islands which were readily removed from the surface of the medium. These " R " colonies were not easily emulsifiable in saline solution. The " S " or smooth colonies were found to grow less rapidly and in a veil-like manner close to the surface of the medium. The " S " colonies were emulsified with ease in saline solution. These investigators also demonstrated that the " R " colony was only capable to produce a localized tubercle when injected parenterally in guinea-pigs. The " S " colony, on the other hand, was found occasionally to produce progressive and fatal tuberculosis in guinea-pigs. It should be emphasized, however, that Petroff and his colleagues have not as yet been able to produce progressive tuberculosis in long series in guinea-pigs injected parenterally with large doses of their " S " strain cultures dissociated from the original BCG culture. Petroff's claim for the occasional virulence of the whole BCG culture has been supported by Loewenstein, Galli-Vallerio, Armengol, Watson, Chiari, Nobel and Sole, Korschun, Dwijkow and Gorochnikowa, Selter and Blumenberg, Sasano and Medlar, while Krause, Park and Gerlach more recently have changed their opinion about the virulence of the BCG culture. Although most investigators have been able to dissociate the BCG culture into typical " R " and " S " colonies, as described by Petroff and his colleagues, yet the claim of virulence for the

" S " colony, as well as the whole BCG culture, has been emphatically denied by Neufeld, Bruno Lange, Gerlach, Prausnitz, Tzekhnowitz, Park, Cantacuzène, Aldershoff, Saenz, and Boquet. The following is my own experience with the dissociated " S " colonies of the BCG-Rockefeller No. 9 strain.

Dissociation of this strain was readily accomplished by emulsifying a 3 weeks culture, grown on Sauton's synthetic medium, in a sterile porcelain mortar. The even suspension of organisms was passed through a sterile Whatman No. 1 filter paper to remove any clumps of organisms. One drop of the filtrate was then allowed to run over the surface of Petroff's gentian-violet-egg medium. A rubber band was placed around the plate to prevent too rapid evaporation. Twenty plates were inoculated and incubated at 37°C. from 3 to 8 weeks. It was noted that the " R " colonies were predominant on all the plates and that only a few typical " S " colonies were available for subcultures. These colonies were picked and sown on slants of Dorset's and Petroff's media. The initial growth was exceedingly slow and corresponded in details to the observations made by Petroff and his colleagues. After several generations of subculturing, growth was accelerated and eventually sufficient growth was available for massive inoculation of animals. Exactly 1 mgm. dry weight of the " S<sub>1</sub> " colony strain was injected intraperitoneally in each of 10 normal and tuberculin-negative guinea-pigs whose average weight was 300 grams. No immediate and unfavorable reactions were observed in any one of the inoculated guinea pigs. Chart VI shows the curves of average growth, tuberculin sensitivity and survival of BCG in the guinea pig body.

Nine guinea-pigs are alive (June 17, 1932) 645 days after the intraperitoneal injection of 1 mgm. of " S " variant colonies of BCG. Guinea-pig No. 143 died from intercurrent non-tuberculous disease 577 days after the intraperitoneal injection of 1 mgm. of the " S " culture. The autopsy material will be discussed below. The average gain in weight has steadily risen from 300 grams to 1036 grams, or a net mean gain of 736 grams. The curve of tuberculin sensitivity with 0.1 cc. of a 5 per cent solution of bovine old tuberculin (Mulford)

reads as follows : 3 weeks after the " S " colony inoculation 40 per cent of the animals reacted positively with tuberculin, in 5 weeks 100 per cent, in 9 weeks 80 per cent, in 12 weeks 60 per cent, in 14 weeks 30 per cent and from 16 to 36 weeks 20 per cent of the group gave positive tuberculin tests. For one year the curve wavered between 20 and 40 per cent of positive reactors and since January 15, 1932, tuberculin tests have been consistently negative in the surviving animals.

*Survival of BCG in guinea-pig body and its recovery in culture.* — During the first 110 days after the intraperitoneal injection of 1 mgm. of the " S " variant colonies of BCG, 6 guinea pigs developed from time to time local abscesses in the abdominal wall at the site punctured during the intraperitoneal inoculation and also in the scrotal sacs. No other symptoms or signs of tuberculous infection occurred in this group of animals during an interim of nearly 2 years following the intraperitoneal " S " colony inoculation. The caseopurulent discharge from the abscesses was sown on Dorset's and Corper's media. Altogether 111 cultures were made and 38 of these tubes showed the presence of colonies of acid-fast organisms on the following days from the intraperitoneal inoculation with the " S " colony culture : 14, 20, 35, 41, 60, 64, 71, 78, 82, 96 and 109 days. During this interim 14 normal guinea pigs were injected with the whole caseous material from these various animals and in no instance was progressive tuberculosis observed in the visceral or thoracic organs when the animals were sacrificed 8 to 10 weeks following the subcutaneous inoculation. The purulent lesions were always confined locally to the area adjacent to the inoculated site. In subcultures the caseous material was shown to contain predominantly " R " colonies, indicating that the " S " colonies injected previously had reverted rather early after inoculation into the guinea pig body.

Autopsy material of guinea pig No. 143 revealed that death was due to pneumonia. No tuberculous lesions were detected grossly or in microscopic sections in the abdominal or thoracic organs. Only 3 small mesenteric glands, the size of a pea, were found to be enlarged and on section to contain a small amount of greenish-yellow thick caseous material. Smears

revealed numerous highly granular acid-fast organisms. The material from one gland was treated by Corper's method and sown on 5 tubes of gentian-violet potato. Two of these tubes presented 1 and 6 colonies respectively of acid-fast organisms after 6 weeks incubation at 37°C. The second gland was macerated in saline and the entire emulsion injected subcutaneously in a normal guinea pig weighing 456 grams. This animal was sacrificed 10 weeks later and showed 3 enlarged inguinal glands at the site of injection. On section these glands showed well formed tubercles, a few small areas of caseation and numerous epithelioid cells. A large amount of tuberculous fibrous tissue indicated that the tuberculous process was well controlled.

The longest period of survival of BCG in the guinea-pig body was 103 days after inoculation, as recorded by Griffith, while Bruno Lange failed to recover BCG in culture from an animal of any species 6 weeks after inoculation. My own cultivation experiments show that the BCG organism may survive in the guinea-pig mesenteric lymph gland as long as 377 days after inoculation without producing progressive tuberculosis. It would appear, therefore, that the "S" colony, dissociated from the whole BCG culture, is harmless when injected into guinea pigs.

II. INTRAPERITONEAL INJECTION IN GUINEA-PIGS OF DEEP BROTH CULTURES OF BCG (DREYER-VOLLUM METHOD). — Dreyer and Vollum recently reported that they had succeeded in enhancing the virulence of BCG for guinea-pigs and rabbits by culturing their 2 strains of BCG (Nos. 1 and 359) in partial anaerobiosis on the bottom of flasks containing veal broth. This startling work was repeated without success by Saenz whose experiments showed that BCG cultivated for several generations on the bottom of peptonized veal broth finally lost its vitality by progressive rarefaction of living elements, to become entirely sterile within 3 months after the first deep broth culture implantation. In the following study an attempt was made to repeat the work of Dreyer and Vollum with the BCG-Park No. 10 strain employed throughout my experiments. On January 13, 1931, liter flasks containing 500 c. c.

of beef infusion broth, pH 6.8, were seeded on the bottom with about 200 mgm. moist weight of a 4 weeks culture of BCG-Park No. 10 grown on Sauton's synthetic medium. Care was taken to eliminate any surface growth. On February 26, the cultures were centrifuged, weighed and transferred to other flasks containing the same amount of beef infusion broth. A small amount of the culture was seeded on Dorset's and Corper's media. Abundant growth took place in 4 weeks at 37° C. No appreciable increment in weight had taken place in the deep broth BCG cultures during the first cultivation of 44 days. On April 1, the second passage of deep broth BCG culture was centrifuged and weighed. No increment in weight had occurred after 77 days of partial anaerobic cultivation of the BCG culture. A small amount of the culture was sown on 6 tubes of Dorset's and Corper's media. Four of these tubes remained sterile after 10 weeks' incubation while the remaining 2 tubes showed scant colony formation. Four normal and tuberculin-negative guinea pigs, weighing on the average 408 grams, were each injected subcutaneously with 35 mgm. moist weight of the second passage deep broth culture of BCG. Chart VII shows the curves of average weight and tuberculin sensitivity of these animals. During an interim of 440 days from the beginning of the experiment, all the animals are alive and have made an average gain in weight of 511 grams. The tuberculin tests became 100 per cent positive 2 weeks after the BCG inoculation and remained solidly positive for 20 weeks. Thirty-two weeks after the BCG inoculation all the animals became anergic to tuberculin. The animals are in excellent health (June 16, 1932) and show no symptoms or signs of tuberculous disease. Thus it appears that BCG cultivated under partial anaerobiosis in deep broth cultures fails to show any increased virulence for guinea-pigs. On the other hand, it is evident that BCG cultivated for several months under partial anaerobiosis, in deep broth cultures, loses its vitality, and, contrary to the claims of Dreyer and Vollum, is absolutely harmless when injected parenterally in guinea-pigs.

## SUMMARY

1. The tuberculinogenic principle of BCG is similar to that possessed by virulent bovine and human\* tubercle bacilli.

2. No appreciable difference obtains in tuberculous guinea-pigs between the allergic cutaneous reaction elicited with tuberculins produced by virulent tubercle bacilli and BCG whether whole or dissociated into " R " and " S " variant colony cultures.

3. The oral administration of BCG in newly-born guinea pigs fails to arouse regularly tuberculin sensitization or any increased resistance to virulent superinfection.

4. The parenteral administration of BCG in guinea-pigs is capable to arouse localized tuberculous lesions which heal promptly without producing progressive tuberculous disease.

5. The parenteral BCG vaccination of guinea-pigs produces regularly tuberculin sensitization and a significant tuberculo-immunity which is most marked in animals vaccinated intracutaneously and subcutaneously.

6. The parenterally BCG vaccinated guinea pigs are relatively twice as refractory to progressive tuberculosis following virulent superinfection than the non-vaccinated animals.

7. Cultivation experiments demonstrate that BCG may survive in the body of the guinea-pig as long as 577 days after inoculation without showing any tendency to produce progressive tuberculosis.

8. Parenteral administration in guinea-pigs of large doses of the " S " smooth colony variant dissociated from BCG is capable to arouse localized tuberculous lesions which heal promptly without producing progressive tuberculosis.

9. BCG cultivated under partial anaerobiosis in deep broth cultures fails to show any increased virulence for guinea pigs, but rather loses its viability after several months' cultivation.

10. The experimental data presented indicate that BCG is harmless as a vaccine and is capable to arouse an outstanding and significant tuberculo-immunity when administered to guinea pigs by the parenteral routes.

## ACKNOWLEDGMENTS.

The author is greatly indebted to Doctors Thomas B. Garlick and Robert I. Walter for assistance during the early part of the study and to Doctor William B. Hawkins, Assistant Professor of Pathology, for much practical assistance in looking over the post-mortem material.

## CONCLUSIONS

1. Le principe tuberculinogène du BCG est identique à celui des bacilles tuberculeux virulents bovins ou humains.

2. Chez les cobayes tuberculeux on n'observe aucune différence appréciable dans les réactions allergiques cutanées produites par les diverses tuberculines provenant soit de bacilles virulents, soit de BCG normal, soit des souches R et S isolées du BCG.

3. L'administration du BCG *per os* aux cobayes nouveau-nés ne les sensibilise pas régulièrement à la tuberculine et n'accroît pas sensiblement leur résistance aux surinfections virulentes.

4. L'injection parentérale du BCG aux cobayes détermine des lésions tuberculeuses localisées qui guérissent promptement sans produire d'infection tuberculeuse progressive.

5. La vaccination par voie parentérale des cobayes sensibilise régulièrement ces animaux à la tuberculine et leur confère une immunité antituberculeuse qui est le plus marquée chez les vaccinés par voie intra-cutanée et sous-cutanée.

6. Les cobayes vaccinés par voie parentérale avec le BCG sont rendus approximativement deux fois plus réfractaires aux surinfections tuberculeuses progressives que les cobayes témoins non vaccinés.

7. Les expériences de culture démontrent que le BCG peut survivre dans l'organisme du cobaye pendant au moins cinq cent soixante-dix-sept jours après l'inoculation sans produire la moindre lésion de tuberculose progressive.

8. L'injection parentérale de fortes doses de cultures provenant de colonies S dissociées du BCG produit chez le cobaye

des lésions tuberculeuses locales qui guérissent promptement et qui ne déterminent pas de tuberculose progressive.

9. Le BCG cultivé en anaérobiose partielle dans le bouillon en profondeur (selon la méthode de Dreyer et Vollum), n'a acquis aucune virulence pour les cobayes; il a, au contraire, fini par perdre sa vitalité après plusieurs mois de culture dans ces conditions.

10. Les faits expérimentaux rapportés montrent que le BCG est un vaccin inoffensif, et qu'il est capable de conférer une immunité antituberculeuse évidente lorsqu'on l'administre aux cobayes par les voies parentérales.

# RECHERCHES SUR L'ANAPHYLAXIE

(DEUXIÈME MÉMOIRE)

## ANAPHYLAXIE TISSULAIRE

par DESPLANQUES, SIMONNET et VERGE.

(École Vétérinaire d'Alfort.)

L'étude des organes ou des tissus *in vitro*, en survie dans un liquide nutritif approprié, a donné d'intéressants résultats, particulièrement en pharmacodynamie, et la technique de ce mode d'investigation est parfaitement au point à l'heure actuelle.

Il n'est pas surprenant que cette méthode ait été employée pour l'analyse du mécanisme du choc anaphylactique. C'est ainsi que Schultz, pour étudier les phénomènes d'anaphylaxie sur les muscles lisses, expérimente sur l'intestin grêle du cobaye.

A cet effet, des cobayes sont sensibilisés par injection de 0 c. c. 01 de sérum de cheval.

Après anesthésie à l'éther et ouverture de la paroi abdominale, Schultz excise 20 à 30 centimètres d'intestin grêle qu'il transporte aussitôt dans un bain salin à 32-34°, pourvu d'un apport continuuel d'oxygène. Ce bain est composé de :

	GRAMMES
NaCl . . . . .	0,85
KCl . . . . .	0,025
CaCl <sup>2</sup> . . . . .	0,023
NaCo <sup>3</sup> H . . . . .	0,02
Glucose . . . . .	0,10
Eau distillée, p. 100 cent. cubes . . . . .	Q. s.

Plongée dans ce liquide, la partie excisée de l'intestin grêle garde ses mouvements péristaltiques. Schultz a constaté que, si l'on ajoute au liquide du bain des quantités variables de

sérum frais de cheval, le muscle sensibilisé présente aussitôt une forte contraction. Quelquefois le muscle reste dans cet état de tonus pendant un temps plus ou moins long; le plus souvent, le segment intestinal se relâche et la courbe retourne au niveau initial, en huit à dix minutes. Le sérum frais de cheval produit également une certaine contraction de l'intestin chez l'animal neuf, mais celle-ci est beaucoup moins accusée que chez l'animal sensibilisé.

Schultz a également observé que la réaction musculaire ne se produit qu'après le douzième jour suivant l'injection sensibilisante; de plus, l'injection de doses répétées de sérum frais de cheval provoque une hypersensibilité musculaire que traduit la méthode graphique.

Les expériences de Schultz furent reprises par Dale qui étudia la réaction anaphylactique des muscles lisses sur des utérus de cobayes vierges, préparées au sérum de cheval.

Dale utilise les deux cornes utérines; de cette façon on étudie simultanément deux organes qui se trouvent très sensiblement dans le même état anatomique et fonctionnel, condition qui peut difficilement être réalisée ailleurs.

La solution de Ringer utilisée était préparée suivant une des deux formules suivantes :

	GRAMMES
NaCl . . . . .	0,9
KCl . . . . .	0,042
CaCl <sup>2</sup> . . . . .	0,012
NaHCo <sup>3</sup> . . . . .	0,05
Glucose . . . . .	0,1
Eau distillée, p. 100 cent cubes . . . . .	Q. s.

La seconde était une modification des formules données par Tyrode et se vérifia un milieu très efficace pour conserver l'excitabilité de l'utérus isolé du cobaye, tout en diminuant sa tendance aux réactions spontanées.

	GRAMMES
NaCl . . . . .	0,9
KCl . . . . .	0,042
CaCl <sup>2</sup> . . . . .	0,024
MgCl <sup>2</sup> . . . . .	0,0075
NaHCo <sup>3</sup> . . . . .	0,05
Glucose . . . . .	0,1
Eau distillée, p. 100 cent. cubes . . . . .	Q. s.

Entre les expériences de Schultz et celles de Dale, il existe une différence fondamentale, car Schultz employait, pour faire l'épreuve des sérums frais, des doses qui provoquaient une contraction légère chez l'animal neuf; la réaction observée chez l'animal anaphylactisé ne lui apparaissait donc que comme l'exagération du phénomène normal.

Or, selon Dale, cette réaction normale est due à une substance toxique accessoire qui disparaît à mesure que les sérums vieillissent; avec des antigènes appropriés comme l'albumine d'œuf cristallisée, on n'en observe pas trace, même pour de fortes doses. Au contraire, l'utérus hypersensible réagit à des doses minimales de ces mêmes antigènes ou de sérums vieillis. Cette question de principe tranchée, Dale n'emploie, pour l'épreuve, que des doses trop faibles pour qu'elles affectent l'utérus normal.

En revanche, l'utérus anaphylactisé réagit d'une manière plus ou moins accentuée à l'addition, dans le liquide qui baigne l'organe, de un millionième de centimètre cube de sérum. La réaction suit l'addition de sérum, sans période de latence autre que celle qui paraît nécessaire pour que le sérum vienne au contact de la fibre musculaire, à travers le liquide, le péritoine et le tissu conjonctif.

Une dose suffisante pour provoquer la contraction maximum détermine une désensibilisation totale.

On peut sensibiliser un même cobaye à trois antigènes différents et obtenir successivement la réaction anaphylactique avec ces trois antigènes. Exemple : sérum de cheval, sérum de mouton et blanc d'œuf. Cependant, si l'on éprouve d'abord avec le blanc d'œuf, on obtient la désensibilisation pour les deux autres antigènes.

Il est également possible d'obtenir sur l'utérus isolé le phénomène de l'anaphylaxie passive. Enfin, lorsqu'un utérus anaphylactisé a été mis en état d'antianaphylaxie, on lui restitue l'hypersensibilité en le suspendant deux heures et demie à trois heures dans un liquide contenant 10 p. 100 du sérum préparant. L'expérience ne réussit pas avec un utérus normal.

La période d'incubation nécessaire pour que l'anaphylaxie active s'établisse varie de huit à douze jours. Que se passe-t-il pendant cette période d'incubation? Le muscle utérin ne répond

pas aux sollicitations avant le huitième jour ; vers cette époque, une grosse dose d'antigène (inférieure à la dose toxique) provoque une réaction légère. La réaction est plus forte vers le dixième jour ; elle atteint son maximum d'intensité pour de faibles quantités d'antigène vers le quatorzième jour.

Il résulte de cet ensemble de faits que les phénomènes observés avec les muscles lisses, utérins ou autres, sont des phénomènes spécifiques, dus à un état spécial de la cellule organique.

R. Weil, utilisant la technique de Dale, étudie la réaction anaphylactique *in vitro* sur des utérus de jeunes cobayes et confirme les expériences des précédents auteurs.

L'anaphylaxie tissulaire de l'utérus n'a pas été réalisée seulement chez des individus sensibilisés au sérum, mais aussi chez des cobayes sensibilisés au lait et au blanc d'œuf (Dale).

Mathew-Walzer et Grove ont étudié l'anaphylaxie tissulaire aux pollens. Ils ont montré que, vis-à-vis de la fibre musculaire utérine d'un animal sensibilisé au pollen, les contractions obtenues sont plus irrégulières que dans le cas de sensibilisation au blanc d'œuf.

L'anaphylaxie tissulaire a été étudiée, non seulement sur l'intestin et l'utérus du cobaye, mais encore sur le cœur. D'après Launoy, le cœur isolé d'un cobaye neuf continue à battre quinze ou vingt minutes dans le liquide de Locke-Ringer et s'arrête ensuite. L'addition à ce liquide de 2,5 p. 100 à 5 p. 100 de son volume de sang de bœuf ou de cheval, frais et défibriné, permet au cœur de battre longtemps et renforce en même temps le tonus du muscle cardiaque. Si, au contraire, le cœur appartient à un animal anaphylactisé (lapin, cobaye), le sérum sensibilisant provoque des modifications qui correspondent à un véritable choc anaphylactique et exerce sur le cœur *une action nettement dépressive*.

Mais si ce cœur a supporté parfaitement le choc qu'il vient de subir, il reprend peu à peu ses battements. Cette reprise se manifeste en perfusion continue avec la solution de Locke-Ringer additionnée de sérum.

Un tel cœur se montre insensible à une nouvelle excitation du même sérum ; il est donc désensibilisé.

A. Leyton, H. Leyton et Sowdon, expérimentant dans des

conditions analogues, sont arrivés aux mêmes résultats.

Heymans étudie longuement l'anaphylaxie du cœur isolé au venin de cobra, il aboutit aux conclusions suivantes :

1° La dépression immédiate mortelle, par injection de venin de cobra chez les lapins anaphylactisés, s'explique par un choc anaphylactique cardiaque.

2° L'intensité de la réaction anaphylactique du cœur isolé, sous l'action du venin de cobra, va en s'accroissant avec la préparation anaphylactique du lapin.

3° Le choc anaphylactique du cœur isolé est une réaction tissulaire et non pas humorale.

4° L'anaphylaxie du cœur isolé n'est pas spécifique.

Des méthodes nouvelles d'enregistrement permettent à l'heure actuelle l'emploi de fibres pulmonaires dans l'expérimentation, ce qui ouvre un champ très vaste et encore inexploré à l'anaphylaxie.

### Recherches personnelles.

Nous avons étudié l'anaphylaxie tissulaire, au sérum de cheval, des cornes utérines de jeunes cobayes vierges; ces cornes ont été placées dans un milieu de survie approprié et dans un appareil spécial, comprenant un thermostat avec ses accessoires, un support à utérus, un myographe et un appareil enregistreur (1). Le milieu de survie employé est celui de Penau et Simonnet. Il est préparé au fur et à mesure des besoins au moyen des deux solutions mères suivantes :

<i>Solution n° 1.</i>	GRAMMES
NaCl cristallisé. . . . .	180
KCl cristallisé . . . . .	8,40
CaCl <sup>2</sup> desséché à 2 H <sup>2</sup> O . . . . .	2,40
MgCl <sup>2</sup> cristallisé . . . . .	0,10
Glucose anhydre . . . . .	10
Eau distillée, p. 100 cent. cubes. . . . .	Q. s.

Cette solution peut se conserver.

(1) Pour la description de l'appareil, le montage, la préparation des solutions, voir H. Penau et H. Simonnet. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1926, 8, p. 125.

*Solution n° 2.*

Bicarbonate de sodium pur. . . . .	5
Eau bi-distillée, p. 100 cent. cubes. . . . .	Q. s.

A préparer extemporanément.

Pour préparer le milieu nutritif, diluer 50 cent. cubes de la solution 1 dans environ 500 cent. cubes d'eau, bien mélanger et ajouter 10 cent. cubes de la solution 2, compléter à un litre.

La solution doit être aérée; un léger barbotage d'air a l'avantage d'assurer, par le brassage du liquide, son homogénéisation parfaite.

Le choix de l'utérus destiné aux expériences constitue le temps le plus délicat de la technique.

L'utérus, en effet, ne forme pas, comme un fragment d'uretère, de vessie ou d'œsophage, un ensemble d'éléments musculaires toujours semblables à eux-mêmes. Il possède sa vie propre. Le développement qu'il subit au moment de la puberté, ainsi que l'involution dont il est frappé à la ménopause, délimitent une période d'accroissement et d'activité maxima. Durant cette période, le tractus génital est le siège, tant au point de vue anatomique qu'au point de vue fonctionnel, et ceci en dehors de la gestation, d'une évolution cyclique, le faisant passer par des minima et des maxima d'activité fonctionnelle.

Les utérus prélevés trop tôt avant la puberté sont de mauvais réactifs. Leur excitabilité est minime et ils sont extrêmement fragiles. Prélevés pendant l'ovulation, ils sont animés de contractions rythmiques et leur excitabilité est très grande.

Pour ces raisons, il faut choisir des femelles vierges, peu éloignées de la puberté dans un sens ou dans l'autre. *C'est là un point essentiel.*

Pour toutes nos expériences, nous avons employé du sérum de cheval hongre, chauffé à 56°C pendant trente minutes, afin d'éviter l'action possible des hormones sexuelles que l'on rencontre dans le sérum de jument et peut-être dans le sérum de cheval entier.

De plus, le sérum employé pour l'épreuve déchainante et le sérum ayant servi à sensibiliser les cobayes provenaient toujours du même lot.

Nous nous sommes toujours efforcés d'opérer dans des con-

ditions identiques, afin de pouvoir comparer, en toute sécurité, l'ensemble des résultats obtenus.

ACTION DU SÉRUM DE CHEVAL HONGRE,  
CHAUFFÉ A 56°C PENDANT TRENTE MINUTES,  
SUR LES CORNES UTÉRINES DE JEUNES COBAYES VIERGES  
NON ANAPHYLACTISÉES.

Les cornes utérines étant mises en place et leur mode réactionnel étant enregistré, on ajoute au bain (75 cent. cubes de Ringer-Locke) 1 cent. cube de sérum de cheval hongre chauffé à 56°C pendant trente minutes. Cette addition ne provoque aucune variation du tonus de l'utérus.

Après lavage soigné de l'organe, la nouvelle addition de 1 cent. cube du même sérum n'entraîne non plus aucune modification.

ACTION DU SÉRUM DE CHEVAL HONGRE,  
CHAUFFÉ A 56°C PENDANT TRENTE MINUTES,  
SUR LES CORNES UTÉRINES DE JEUNES COBAYES VIERGES.  
ANAPHYLACTISÉES PAR ET POUR CE SÉRUM.

Pour toute cette série d'expériences, nous avons employé des cobayes anaphylactisés par une injection, sous la peau de la cuisse droite, d'un dixième de centimètre cube de sérum de cheval hongre, chauffé à 56°C pendant trente minutes.

Afin de nous assurer que les cornes utérines utilisées provenaient bien de cobayes anaphylactisés, nous sensibilisons toujours deux animaux à la fois et, au moment d'expérimenter, un des sujets recevait une injection intracardiaque de 1 cent. cube de sérum : il succombait au choc anaphylactique ; l'autre cobaye nous servait alors à prélever les cornes utérines et à expérimenter sur elles.

Chaque corne utérine était placée à son tour dans l'appareil, suivant la technique indiquée.

Nous avons ainsi la possibilité de faire deux expériences identiques avec le même cobaye, les réactions des deux cornes se contrôlant réciproquement.

RECHERCHE DE LA DOSE MINIMA DE SÉRUM DE CHEVAL HONGRE  
QU'IL FAUT AJOUTER AU BAIN  
POUR OBTENIR UN CHOC ANAPHYLACTIQUE.

On sait que le choc anaphylactique, au niveau des cornes utérines isolées, se traduit par une contraction brusque de celles-ci.

Nos essais nous ont permis de constater que la dose minima nécessaire pour provoquer une contraction de l'utérus était de 1/100.000 de centimètre cube de sérum de cheval hongre, chauffé à 56°C pendant une demi-heure.

Pour des doses plus fortes de sérum, nous avons obtenu des contractions de plus en plus violentes et durables : 1/10 de centimètre cube, par exemple, déclenche un létanos qui dure de dix à trente minutes et le retour au calme ne s'obtient plus, l'utérus continuant de présenter des contractions rythmiques.

Aussi avons-nous fixé notre choix sur cette dose de 1/10 de centimètre cube de sérum. L'utérus d'un cobaye, qui a répondu par une contraction à l'addition de 1/10 de centimètre cube de sérum de cheval ou même à l'addition d'une dose plus faible, ne se contracte plus lorsqu'on le sollicite par une nouvelle addition de sérum. La première réponse a donc *désensibilisé* la corne utérine et la laisse dans le même état, au point de vue sensibilisation, qu'une corne provenant d'un animal non anaphylactisé.

ACTION DU SÉRUM DE CHEVAL HONGRE,  
CHAUFFÉ A 56°C PENDANT UNE DEMI-HEURE  
SUR LES CORNES UTÉRINES DE JEUNES COBAYES VIERGES,  
NÉES DE MÈRES ANAPHYLACTISÉES PENDANT LA GESTATION.

Ayant eu de jeunes femelles de cobayes nées de mères anaphylactisées pendant la gestation, nous avons interrogé leurs cornes utérines, afin de savoir si elles étaient ou non en état d'anaphylaxie.

De nos expériences, il ressort que l'addition de 1/10 de centimètre cube ou même de 1 cent. cube de sérum au bain nutritif ne provoque aucune contraction des cornes, ce qui prouve que

les petits, nés de femelles anaphylactisées pendant la gestation, ne sont pas en état d'anaphylaxie.

#### ÉTUDE DE LA SPÉCIFICITÉ DE L'ANAPHYLAXIE TISSULAIRE.

Nous avons étudié ensuite la spécificité de l'anaphylaxie tissulaire en faisant agir, sur les cornes utérines de jeunes cobayes sensibilisées par et pour le sérum de cheval hongre, chauffé à 56° pendant une demi-heure :

1° Du sérum de lapin. . . . .	} Chauffés eux aussi à 56° pendant une demi-heure.
2° Du sérum de bœuf. . . . .	
3° Du sérum de cobaye. . . . .	

L'addition, au liquide de Ringer, de 1/10 de centimètre cube de sérum de bœuf ou de lapin déclenche des effets à peine décelables : il se produit une très légère contraction, mais qui n'a absolument rien de comparable avec la contraction provoquée par le sérum de cheval. Cette contraction, de très peu d'amplitude, dure de une à trois minutes seulement ; l'utérus reprend ensuite et très rapidement son calme.

Mais le caractère le plus important qu'il convient de souligner, c'est que l'utérus ne se trouve aucunement désensibilisé par cette petite réaction. Il réagit aussi fortement que si rien n'était, à l'addition, après lavage, de 1/10 de centimètre cube de sérum de cheval hongre, chauffé à 56°C pendant une demi-heure.

Si au lieu d'opérer avec du sérum de lapin ou de bœuf, nous opérons avec du sérum homologue de cobaye chauffé à 56°C pendant une demi-heure, nous obtenons des résultats absolument identiques aux précédents et ne remarquons jamais de désensibilisation de la corne utérine. Cette désensibilisation aurait été observée cependant par Kellaway et Cowell avec du sérum normal de cobaye.

#### DÉSENSIBILISATION « IN VITRO » DES CORNES UTÉRINES PAR LA MÉTHODE DES DOSES SUBINTRANTES DE BESREDKA.

Nous avons voulu appliquer à l'anaphylaxie tissulaire la méthode de désensibilisation de Besredka.

Pour cela nous avons prélevé les cornes utérines de cobayes

sensibilisées par et pour le sérum de cheval hongre, chauffé à 56°B pendant une demi-heure et les avons disposées dans l'appareil suivant notre technique. Nous avons ajouté au liquide de Ringer 1/10.000.000 de centimètre cube de sérum de cheval. Cette addition n'a provoqué aucune contraction de la part des cornes. Après dix minutes de contact, nous avons lavé à fond et ajouté à nouveau 1/10.000.000 de centimètre cube de sérum. Nous avons renouvelé la même opération en ajoutant alors 1/1.000.000 de centimètre cube, sans obtenir de contractions. Après un dernier lavage, nous avons pu ajouter, suivant les expériences, 1/10 ou même 1 centimètre cube de sérum de cheval sans obtenir la moindre contraction des cornes utérines.

Nous avons donc désensibilisé les cornes utérines par cette méthode classique de Besredka.

#### ESSAI DE SENSIBILISATION « IN VITRO ».

Nous avons essayé de sensibiliser *in vitro* au sérum de cheval des cornes utérines de cobayes neufs.

Nous avons prélevé des cornes utérines de cobayes neufs et les avons mises en contact pendant deux, quatre ou cinq heures avec du liquide de Ringer contenant 1/10, 1 ou même 5 cent. cubes de sérum de cheval hongre chauffé à 56°C pendant une demi-heure. Nous les avons éprouvées alors, mais sans succès, avec 1/10 de centimètre cube de sérum de cheval.

Nous ne sommes donc pas parvenus à sensibiliser *in vitro* les cornes utérines. Dale, contrairement à nous, aurait cependant obtenu la sensibilisation des cornes utérines, après contact de quatre à cinq heures.

#### Conclusions.

De tout ce qui précède, nous concluons que :

1° La dose minima de sérum qui déclenche une contraction de la corne utérine chez le cobaye anaphylactisé est de 1/100.000 de centimètre cube.

2° Une réaction désensibilise l'utérus, lequel ne se montre plus sensible à l'addition de nouvelles doses de sérum.

3° L'anaphylaxie tissulaire est strictement spécifique.

4° Contrairement aux affirmations de Kellaway et Cowell, une addition de sérum de cobaye ne protège pas les cornes sensibilisées contre une addition de sérum de cheval hongre chauffé à 56°C pendant trente minutes.

5° La méthode de Besredka s'applique aussi à l'anaphylaxie tissulaire.

6° Il nous a été impossible de sensibiliser, *in vitro*, les cornes utérines.

---

Le Gérant : G. MASSON.





